

**НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ
імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»**

Факультет біотехнології і біотехніки

Кафедра промислової біотехнології

До захисту допущено:

Завідувач кафедри

_____ Тетяна ТОДОСІЙЧУК

«___» _____ 2020 р.

Дипломний проєкт

на здобуття ступеня бакалавра

за освітньо-професійною програмою «Промислова біотехнологія»

спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»

**на тему: «Технологія виробництва біоспорино у флаконах. Дільниця
сушіння продукту»**

Виконала:

студентка IV курсу, групи БТ-62

Юрченко Емма Володимирівна _____

Керівник:

доцент каф. промислової біотехнології, к.б.н., с.н.с.

Яловенко Олена Ігорівна _____

Консультант з

Розділу 5. Розрахунок обладнання для проведення технологічного процесу:

ст. викл. каф. біотехніки та інженерії, к.т.н

Фесенко Сергій Вікторович _____

Рецензент:

асистент каф. екобіотехнології та біоенергетики, к.т.н.

Зубченко Людмила Сергіївна _____

Засвідчую, що у цьому дипломному
проєкті немає запозичень з праць інших
авторів без відповідних посилань.

Студентка _____

Київ – 2020 року

ВІДОМІСТЬ ДИПЛОМНОГО ПРОЄКТУ

№ з/п	Формат	Позначення	Найменування	Кількість листів	Примітка
1	A4		Завдання на дипломний проєкт	2	
2	A4	ДП 6222. 00.000 ПЗ	Пояснювальна записка	144	
3	A1	ДП 6222. 01.000 ТК	Технологічна схема	2	
4	A1	ДП 6222. 02.000 ТК	Апаратурна схема	1	
5	A1	ДП 6222. 03.000 ТК	Сублімаційна сушарка	1	

				ДП 6222 00.000.00		
	ПБ	Підп.	Дата	Відомість дипломного проєкту		
Розробн.	Юрченко Е.В					
Керівн.	Яловенко О.І.					
Консульт.	Фесенко С.В.					
Н/контр.						
Зав.каф.	Тодосійчук Т.С.			Лист 1 Листів 144 КПП ім. Ігоря Сікорського Каф. ПБТ Гр. БТ-62		

Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»

Факультет біотехнології і біотехніки
Кафедра промислової біотехнології

Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)

Спеціальність – 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Освітньо-професійна програма «Промислова біотехнологія»

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

_____ Тетяна ТОДОСІЙЧУК

«_27_» лютого 2020 р.

ЗАВДАННЯ

на дипломний проєкт студенту

Юрченко Еммі Володимирівні

1. Тема проєкту «Технологія виробництва біоспорину у флаконах. Дільниця сушіння продукту», керівник проєкту Яловенко Олена Ігорівна, к.б.н, доц., затверджені наказом по університету від «21» травня 2020 р. № 1125-с

2. Термін подання студентом проєкту _____

3. Вихідні дані до проєкту: пробіотичні штами *Bacillus subtilis* УКМ В-5007 та *Bacillus licheniformis* УКМ В-5514; середовище культивування – модифіковане середовище складу: кукурудзяне борошно, крохмаль, крейда, сульфат амонію; параметри культивування: $t = 37 \pm 1^\circ\text{C}$, аерація, $\tau = 26\text{-}36$ год; сублімаційна сушарка шкафного типу для видалення вологи – загальною площею касет $13,31 \text{ м}^2$; спосіб сушіння продукту – сублімаційне висушування; параметри сушіння: $W_1 = 85\%$, $W_2 = 4\%$, $t_3 = -40^\circ\text{C}$; $\tau_3 = 24$ год; $p = 26 \text{ Па}$; $t_c = 34^\circ\text{C}$; $\tau_c = 36$ год, $G_1 = 257,4 \text{ кг/цикл}$; кінцевий продукт – пробіотичний препарат у флаконах для лікувально-профілактичних цілей.

4. Зміст пояснювальної записки: підібрати і охарактеризувати мікроорганізм для виробництва пробіотичного препарату; провести аналіз методів

створення високопродуктивних промислових продуцентів, обґрунтувати схему отримання продуценту, що використовується у проєкті; визначити основні фізико-хімічні характеристики кінцевого продукту та біохімічні основи його виробництва; скласти матеріальний баланс виробництва, розробити технологічну і апаратурну схему; обґрунтувати вибір конструкції сублімаційної сушарки, здійснити технологічний та конструктивний розрахунки.

5. Перелік графічного матеріалу (із зазначенням обов'язкових креслеників, плакатів, презентацій тощо): креслення загального виду сублімаційної сушарки – 1 арк. А1, технологічна схема – 2 арк. А1, апаратурна схема – 1 арк. А1

6. Консультанти розділів проєкту

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Розділ 5	Фесенко С.В., ст. викл. каф. біотехніки та інженерії		

7. Дата видачі завдання _____

Календарний план

№ з/п	Назва етапів виконання дипломного проєкту	Термін виконання етапів проєкту	Примітка
1.	Характеристика біологічного агента	01.04.20-14.04.20	
2.	Біохімічні основи виробництва	01.04.20-14.04.20	
3.	Методи отримання промислових продуцентів	01.04.20-14.04.20	
4.	Технологічна частина	14.04.20-22.04.20	
5.	Складання апаратурної схеми	14.04.20-22.04.20	
6.	Охорона праці	28.04.20-15.05.20	
7.	Розрахунок обладнання для проведення технологічного процесу	28.04.20-15.05.20	
8.	Подання дипломного проєкту до експертної комісії	30.05.20-08.06.20	

Студент

Емма ЮРЧЕНКО

Керівник

Олена ЯЛОВЕНКО

**Пояснювальна записка
до дипломного проєкту
на тему: «Технологія виробництва біоспорину у
флаконах. Дільниця сушіння продукту»**

Київ – 2020 року

РЕФЕРАТ

Дипломний проект: 144 с., 11 рис., 4 табл., 67 посилань.

Робота присвячена розробці технології виробництва пробіотичного препарату Біоспорин та дільниці сушіння продукту. В якості пробіотичних бактерій запропоновано використовувати штами спороутворюючих бактерій *Bacillus subtilis* УКМ В-5007 та *Bacillus licheniformis* УКМ В-5514, які є високостійкими до несприятливих умов зовнішнього середовища, володіють високою ферментативною та антагоністичною активністю щодо патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів. Обрані *Bacillus subtilis* УКМ В-5007 та *Bacillus licheniformis* УКМ В-5514 отримано в результаті селекції з використанням фізичного мутагенезу.

Розраховано та вибране найбільш ефективне та перспективне обладнання для сушіння біомаси продуктивністю за вологим продуктом 257,4 кг/цикл. Наведено технологічний та конструктивний розрахунки сублімаційної сушарки, обґрунтовано та подано технологічну та апаратурну схеми виробництва пробіотичного препарату Біоспорин.

Представлена в проекті технологія повністю відповідає санітарно-гігієнічним вимогам, наведено вимоги до охорони праці та навколишнього середовища.

ПРОБІОТИЧНИЙ ПРЕПАРАТ, СПОРОУТВОРЮЮЧІ БАКТЕРІЇ, *BACILLUS SUBTILIS*, *BACILLUS LICHENIFORMIS*, СУБЛІМАЦІЙНЕ ВИСУШУВАННЯ, МІКРОФЛОРА, БІОСПОРИН, ДИСБАКТЕРІОЗ, САМОЕЛІМІНАЦІЯ.

					ДП 6222. 00.000 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РЕФЕРАТ	Стадія	Аркуш	Аркушів
Розробив		Юрченко Е.В.				Д	5	144
Консульт.						КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		
Керівник		Ялобенко О. І.						
Затвер.								

ABSTRACT

The graduation project: 144 pages, 11 figures, 4 tables, 67 references.

The project is devoted to the development of technology for the production of probiotic drug Biosporin and the product drying section.

As probiotic bacteria it is proposed to use strains of spore-forming bacteria *Bacillus subtilis* UKM B-5007 and *Bacillus licheniformis* UKM B-5514, which are highly resistant to adverse environmental conditions, have high enzymatic and antagonistic activity against pathogens and opportunistic pathogens. Selected *Bacillus subtilis* UKM B-5007 and *Bacillus licheniformis* UKM B-5514 were obtained by selection using physical mutagenesis.

The most efficient and promising equipment for biomass drying with a wet product productivity of 4,29 kg/h was calculated and selected. Technological and constructive calculations of the freeze dryer are given, the technological and equipment schemes of production of probiotic preparation Biosporin are substantiated and presented.

The technology presented in the project fully meets the sanitary and hygienic requirements, the requirements for labor protection and the environment are given.

PROBIOTIC DRUG, SPORE-FORMING BACTERIA, BACILLUS SUBTILIS, BACILLUS LICHENIFORMIS, FREEZE DRYING, MICROFLORA, BIOSPORIN, DYSBIOSIS, SELF-ELIMINATION.

					ДП 6222. 00.000 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	ABSTRACT	Стадія	Аркуш	Аркушів
Розробив		Юрченко Е.В.				Д	6	144
Консульт.						КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		
Керівник		Яловенко О. І.						
Затвер.								

ЗМІСТ

ВСТУП.....	9
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНИХ АГЕНТІВ.....	11
1.1 Основні промислові продуценти.....	11
1.2 Систематичне положення.....	13
1.3 Морфолого-цитологічні ознаки.....	13
1.4 Культуральні ознаки.....	15
1.5 Фізіолого-біохімічні ознаки.....	17
1.6 Фактори патогенності.....	22
1.7 Поширення в природі.....	23
РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА.....	24
2.1 Характеристика кінцевого продукту.....	24
2.2 Метаболізм вуглеводів та продукти конструктивного метаболізму пробіотичних мікроорганізмів.....	28
2.3 Характеристика компонентного складу біотехнологічного препарату, отриманого в процесі реалізації технології.....	38
2.4 Механізми впливу цільового продукту на біохімічні процеси.....	39
РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ....	42
3.1 Генетична вивченість біологічного об'єкту	42
3.2 Загальні методи створення високопродуктивного промислового продуценту	47
3.2.1 Використання природного та штучного добору для отримання промислових продуцентів.....	49
3.2.2 Використання індукованого мутагенезу.....	50
3.2.3 Використання гібридизації для створення промислових продуцентів біологічно-активних речовин.....	53

					ДП 6222. 00.000 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	ВСТУП	Стадія	Аркуш	Аркушів
Розробив		Юрченко Е.В.				Д	7	144
Консульт.								
Керівник		Яловенко О. І.				КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		
Затвер.								

3.3	Схема отримання пробіотичних організмів, що використовуються в роботі.....	54
3.3.1	Опис схеми отримання продуцентів.....	54
3.3.2	Схема отримання продуцентів.....	58
РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА.....		60
4.1	Характеристика кінцевої продукції виробництва.....	60
4.2	Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів, що використовується у виробництві.....	64
4.3	Опис технологічного процесу.....	68
4.4	Матеріальний баланс.....	99
4.5	Контроль виробництва.....	103
4.6	Технологічна схема виробництва.....	117
РОЗДІЛ 5. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ.....		118
5.1	Обґрунтування вибраної конструкції. Підбір конструкційних матеріалів для окремих елементів апарату.....	118
5.2	Розрахунок сублімаційної сушарки періодичної дії.....	122
5.2.1	Розрахунок основних розмірів сублімаційної камери.....	122
5.2.2	Розрахунок маси сублімаційної камери.....	124
5.2.3	Розрахунок температури теплоносія на вході і на виході з плит.....	126
5.2.4	Розрахунок діаметру вакуумного трубопроводу.....	128
5.2.5	Розрахунок теплових витрат.....	129
5.2.6	Розрахунок продуктивності апарату	131
5.3	Вибір загальнозаводського обладнання.....	132
5.4	Вимоги до охорони праці та навколишнього середовища.....	133
ВИСНОВКИ.....		136
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ.....		137

ВСТУП

Значне погіршення екологічної обстановки на планеті, посилення персистенції санітарно-показових мікроорганізмів у зовнішньому середовищі під впливом різних техногенних забруднень, пасивна селекція антибіотикорезистентних форм бактерій у медичних стаціонарах призвели до дисбалансу у мікробіоценозах організму людини і у природі. Це свідчить про вагомому значимість проблеми, пов'язаної зі стійкістю патогенної мікрофлори, як до лікувальних препаратів, так і в оточуючому середовищі взагалі. Пошкодження будь-якої складової такої багатокомпонентної системи як внутрішній людський мікробіоценоз може порушувати його рівновагу і сприяти розвитку захворювань як ендогенного, так і екзогенного походження.

Використання широкого спектру бактеріотерапевтичних препаратів і продуктів функціонального харчування, збагачених пробіотичними мікроорганізмами є основою сучасних методів корекції порушень у мікробній екосистемі людини [1,2]. Традиційно пробіотики використовуються для зниження кількості патогенної, умовно-патогенної і відновлення нормальної мікрофлори кишечника при гострих кишкових інфекціях та дисбактеріозах у дітей та дорослих. Серед сучасних тенденцій в області створення пробіотичних препаратів є розширення показань до їх призначення і конструювання препаратів із заданими властивостями [3].

Актуальність розробки пробіотичних препаратів, на основі спороутворюючих бактерій роду *Bacillus*, полягає в тому, що здатність утворювати ендоспори сприяє високій стійкості цих бактерій, що вигідно відрізняє їх від біфідобактерій і лактобацил. Штами видів *Bacillus subtilis* та *Bacillus licheniformis* є високостійкими до несприятливих умов зовнішнього середовища, володіють високою ферментативною та антагоністичною активністю щодо патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів. Крім того, вони є продуцентами біологічно-активних речовин, що не викликають розвиток патологічного стану у людей. Пробиотики у ліофілізованій формі

					ДП 6222. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		9

мають більш тривалий термін зберігання, ніж рідкі, вони менш залежні від умов зовнішнього середовища і тому мають більш м'які вимоги зберігання ніж пробіотики рідкої форми випуску.

Вищенаведені факти обумовлюють перспективність використання бактерій роду *Bacillus*, як основи для розробки лікувально-профілактичних препаратів [4]. Технологія виробництва пробіотичних препаратів є відносно простою та зводиться до вирощування одного чи декількох пробіотичних мікроорганізмів на відповідних поживних середовищах з наступним висушуванням культуральної рідини за наявності захисних середовищ [2]. Однак, сухі пробіотичні препарати мають і недолік – при ліофілізації бактерії втрачають частину своїх корисних властивостей. Тому важливим для вирішення питання є підбір захисного середовища для уникнення інактивації пробіотичних культур [4].

Метою дипломного проекту є розробка технології виробництва препарату Біоспорину з використанням процесу сублімаційного висушування культур *B. subtilis* та *B. licheniformis*.

Для досягнення означеної мети необхідно вирішити такі завдання:

- дати характеристику біологічним агентам – компонентам пробіотичного препарату та описати методи їх отримання;
- запропонувати методи отримання промислових штамів;
- описати біохімічні основи виробництва та дати характеристику кінцевому продукту, зокрема, визначити композиційний склад захисного середовища;
- обґрунтувати та вибрати технологічне обладнання і режими його роботи при висушуванні біомаси;
- описати технологічний процес та скласти схему виробництва, розрахувати матеріальний баланс.

					ДП 6222. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		10

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНИХ АГЕНТІВ

1.1 Основні промислові продуценти

Пробіотичні препарати – це препарати на основі живих мікроорганізмів та речовин мікробного походження, які здійснюють позитивну регуляцію мікрофлори кишечника. Перелік пробіотичних мікроорганізмів, які можуть позитивно діяти на здоров'я людини, є досить широким. Мікроорганізми-продуценти молочної кислоти (біфідобактерії та лактобактерії) є найбільш типовими представниками нормальної мікрофлори людини і відносяться до основних пробіотиків, проте, окрім них, у виробництві пробіотичних препаратів також використовуються *E. coli*, *S. cerevisiae*, *S. thermophilus* та інші [3,5].

Мікроорганізми в пробіотичних препаратах мають бути безпечними для здоров'я, деяким з них було присвоєно GRAS-статус. EFSA присвоїла GRAS-статус 5 видам біфідобактерій (*Bifidobacterium spp.*), 33 видам лактобактерій (*Lactobacillus spp.*), а також *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc spp.*, *Pediococcus spp.*, *Propionibacterium freudenreichii* і *Streptococcus thermophilus* [6].

Мікроорганізми роду *Bacillus* є найчисленнішою групою паличкоподібних грампозитивних бактерій, для яких є характерним підвищене спороутворення. Ці бактерії постійно проникають в шлунково-кишковий тракт і дихальні шляхи здорових людей з їжею, водою і повітрям. У науковій літературі є повідомлення про виділення *B. subtilis* з шлунково-кишкового тракту здорових дорослих і дітей. Кількість цих мікроорганізмів в шлунково-кишковому тракті може досягати 10^7 КУО на 1 грам, що можна порівняти з кількістю лактобактерій. З цієї причини дослідники стверджують, що мікроорганізми роду *Bacillus* є одними з домінуючих

					ДП 6222. 00.000 ПЗ		
Зм.	Арж.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розробив		Юрченко Е.В.			РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНИХ АГЕНТІВ	Стадія	Аркуш
Консульт.						Д	11
						Аркушів	
						144	
Керівник		Ялашенко О. І.				КПІ ім. Ігоря Сікорського	
Затвер.						ФБТ	

компонентів кишкової мікрофлори [7].

Пробіотичний препарат Біоспорин містить бактерії роду *Bacillus*, а саме – *Bacillus subtilis* УКМ В-5007 та *Bacillus licheniformis* УКМ В-5514. Повнота вивчення цих видів дозволяє створювати різноманітні пробіотичні препарати. Біоспорин відноситься до покоління пробіотиків, що самоелімінуються, тобто таких, що без сторонніх впливів самостійно виводяться з організму.

Здатні до спороутворення бактерії роду *Bacillus* є перспективними конкурентами патогенній мікрофлорі. Серед їх переваг виділяють:

- стійкість до несприятливих зовнішніх умов;
- високу ферментативну й антагоністичну активність по відношенню до патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів;
- продукування біологічно-активних речовин (ферментів, вітамінів та амінокислот), що дозволяє їм діяти як біокаталізатор у кишечнику;
- здатність підвищувати неспецифічну резистентність організму;
- неспроможність викликати розвиток патологічного стану в організмі людини.

Вищезначені пункти роблять бактерії роду *Bacillus* перспективними для використання при розробці лікувально-профілактичних препаратів. Зокрема, бактерії роду *Bacillus* здатні продукувати широкий спектр антибіотиків, а деякі штами – індукують синтез ендogenous інтерферону.

Перорально потрапляючи в організм, спори бацил починають проростати, а утворені вегетативні бактеріальні клітини – розмножуватися. Як наслідок, верхні відділи шлунково-кишкового тракту людини стають зонами антагоністичного інгібування патогенних мікроорганізмів, кількість яких починає зменшуватися до повного зникнення. Тобто, вони виконують роль природних антибіотиків, абсолютно безпечних для організму людини [8].

					ДП 6222. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		12

1.2 Систематичне положення

Бактерії видів *Bacillus subtilis* та *Bacillus licheniformis* є представниками роду *Bacillus* та належать до 18-ї групи “Грампозитивні палички і коки, що утворюють ендоспори”, категорії II “Грампозитивні еубактерії, що мають клітинні стінки”, підцарства справжніх бактерій (*Eubacteria*), царства еукаріотів (*Eukaryota*) за визначником бактерій Берджі 9-го видання [9].

1.3 Морфолого-цитологічні ознаки

Бактерії роду *Bacillus* є прямими паличками $0,5-2,5 \times 1,2-10$ мкм з заокругленими або “обрубленими” кінцями, вони часто згруповані в парах або ланцюжках. Грампозитивні. Рухомі за рахунок перитрихіальних джгутиків. Ендоспори овальні або іноді сферичні чи циліндричні, дуже стійкі до багатьох несприятливих впливів. В клітині утворюється не більше однієї спори. Споруючі не подавляються в атмосфері повітря. Зазвичай каталазопозитивні [10].

Bacillus subtilis (див. Рис. 1.1) та *Bacillus licheniformis* (див. Рис. 1.2) належать до групи *Bacillus subtilis* та є дуже спорідненими, їх важко розрізнити. Клітини цих бактерій мають ширину менш ніж 1 мкм, спорангії не набухлі. Капсули, слизові шари або чохла відсутні.

Леван є запасним полісахаридом *Bacillus subtilis* та *Bacillus licheniformis*, це лінійний гомополісахарид, що утворений залишками метилового ефіру β -D-фруктози, мономери якого з'єднані 1-6-глікозидним зв'язком. Полімер має невелику довжину – 10-12 мономерів [10].

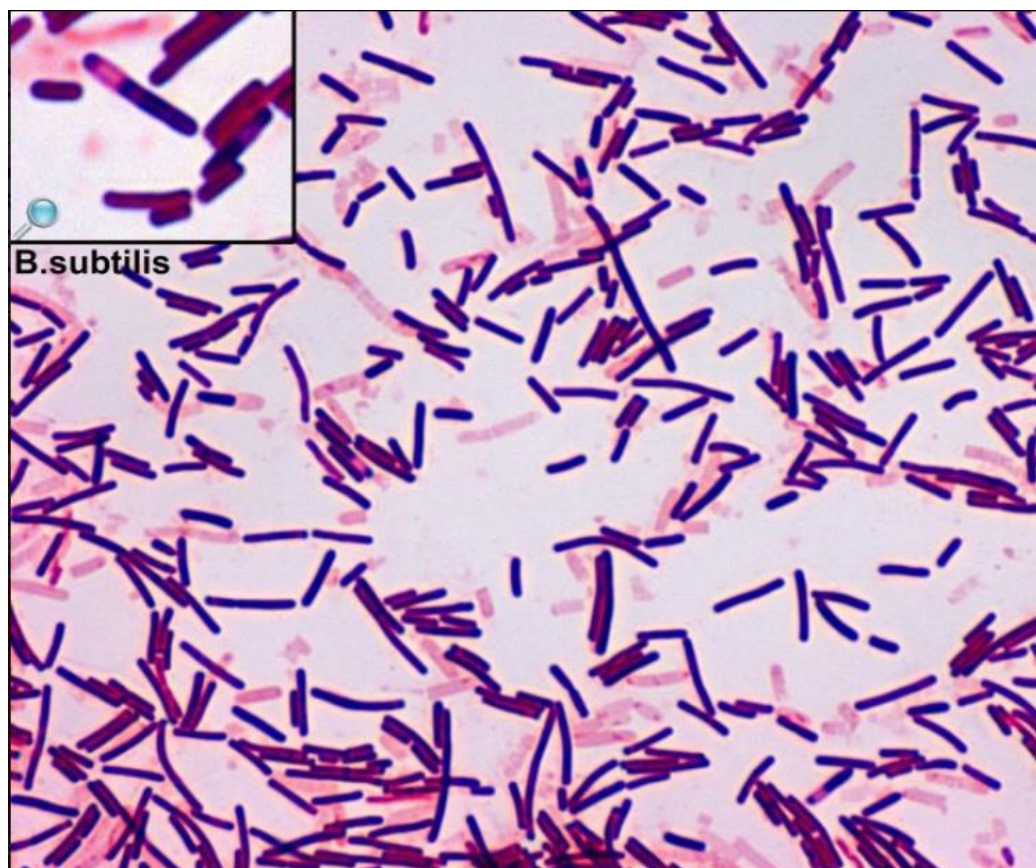


Рис. 1.1 Мікрофотографія клітин *Bacillus subtilis* [11]

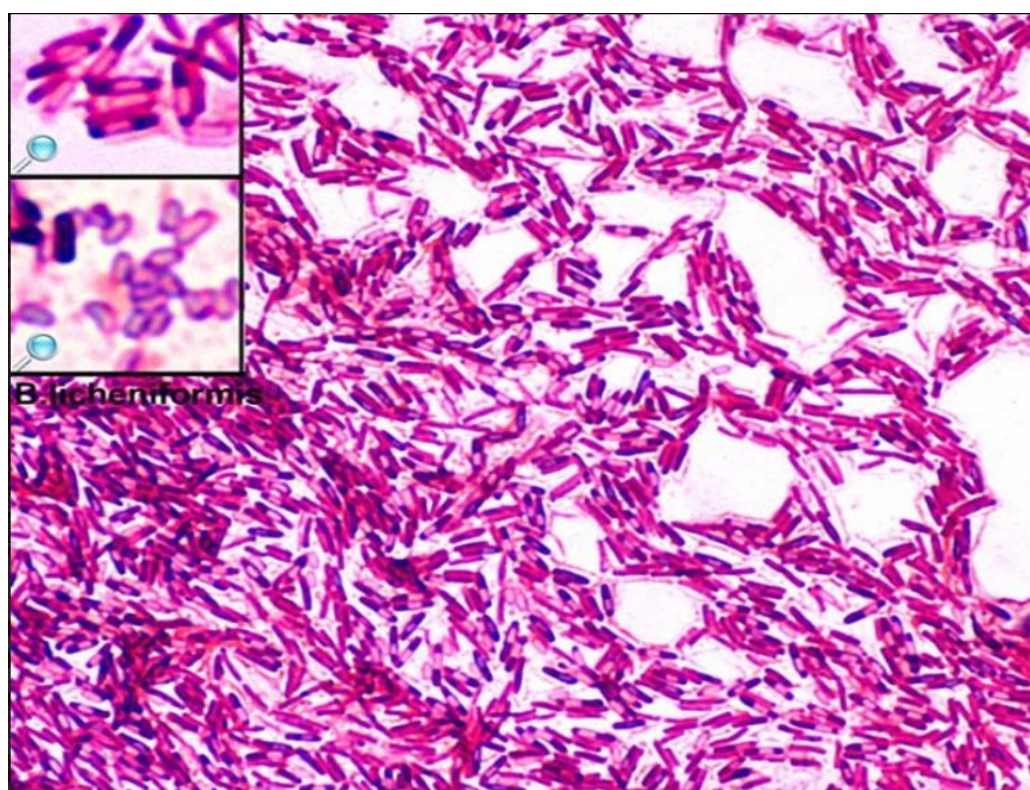


Рис. 1.2 Мікрофотографія клітин *Bacillus licheniformis* [11]

1.4 Культуральні ознаки

Клітини, що вирости на глюкозному агарі, забарвлюються рівномірно. Морфологія колоній *Bacillus licheniformis* (див Рис. 1.3) та *Bacillus subtilis* (див. Рис. 1.4) різноманітна всередині та між штамами, тому вони можуть мати вигляд змішаної культури. Колонії мають округлу або неправильну форму та помірний (2-4 мм) діаметр, краї варіюються від хвилястих до торочкуватих. Колонії з плином часу поступово стають непрозорими, а матові поверхні можуть стати зморшкуватими.

Текстури колоній *B. subtilis* та *B. licheniformis* варіюються від вологих до маслянистих або слизистих. Такі текстури формуються завдяки слизистому матриксу, який лежить під мембраною. Слизисті бусини на поверхні можуть бути відсутні, тоді текстура – колоній груба та суха.

Колір колоній *B. licheniformis* білуватий, проте може стати кремовим або коричневим (можливо також отримати червоний колір на вуглеводному середовищі, яке містить достатню кількість заліза).

					ДП 6222. 00.000 ПЗ	Арк.
						15
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		



Рис. 1.3 Колонії *B. licheniformis* на кров'яному агарі [11]

Лишайниковподібні колонії *B. licheniformis* мають тенденцію бути досить прилиплими до агару [12].

B. subtilis можуть утворювати пігменти, колір яких варіюється від жовтого, оранжевого, рожевого та червоного до коричневого або чорного на картопляних або агарових середовищах, які містять глюкозу.



Рис. 1.4 Колонії *B. subtilis* на кров'яному агарі [11]

1.5 Фізіолого-біохімічні ознаки

Бактерії роду *Bacillus* – аеробні та факультативно-анаеробні мікроорганізми, які за типом живлення являються гетеротрофами.

B. licheniformis є факультативно-анаеробним мікроорганізмом. Мінімальною температурою для росту *B. licheniformis* є 15 °С, максимальною – 50-55 °С. Ріст відбувається за рН від 5,7 до 6,8, проте границі чітко не означені [12]. Оптимальною температурою для росту є 30 °С, а оптимальна кислотність середовища – рН 6,5 [13].

Вид *B. licheniformis* росте у присутності до 7% NaCl. Він здатний до гідролізу казеїну, ескуліну, желатину та крохмалю, деякі штами здатні до гідролізу сечовини. *B. licheniformis* не здатний дезамінувати фенілаланін. Розкладає пектин та полісахариди рослинних тканин. Утворює декстран та леван внутрішньоклітинно з сахарози. Цитрат та пропіонат можуть

використовуватися в якості єдиного джерела вуглецю більшістю штамів. Багато штамів *B. licheniformis* здатні відновлювати нітрати.

B. subtilis – вважається облигатним аеробом. Оптимальна температура росту *B. subtilis* становить 28-30 °С, з мінімумом 5-20 °С та максимумом при 45-55 °С. Ріст відбувається при рН від 5,5 до 8,5, проте границі чітко не означені. Це гетеротрофний аеробний організм, але відомо, що деякий обмежений анаеробний ріст може відбуватися на складних середовищах з глюкозою або (менш ефективно) з нітратом. Ріст також можливий на мінімальному середовищі з глюкозою та сіллю амонію в якості єдиних джерел вуглецю та азоту. Мікроорганізми виду *B. subtilis* можуть розвиватися на небілкових синтетичних поживних середовищах з амонійними солями або нітратами [12,14].

Вид *B. subtilis* росте в присутності 7% NaCl, деякі штами витримують 10% NaCl. Гідролізує казеїн, ескулін, желатин та крохмаль, проте не здатний гідролізувати фенілаланін та сечовину. Як і *B. licheniformis* розкладає пектин та полісахариди рослинних тканин, утворює декстран та леван внутрішньоклітинно з сахарози. Цитрат може використовуватися більшістю штамів в якості єдиного джерела вуглецю, пропіонат не використовується. Нітрат *B. subtilis* здатні перетворювати в нітрит [12]. Глибинне культивування *B.subtilis* і *B.licheniformis* проводять за температури 37 °С.

Основним джерелом азотного живлення для *B. subtilis* та *B. licheniformis*, як і для багатьох інших непатогенних спороутворюючих бактерій, є білкова сировина, зокрема: пептони, соя, казеїн, горох тощо. У якості джерела вуглецю, у складі поживних середовищ, може використовуватися глюкоза [14,15].

Отже, *B.subtilis* і *B.licheniformis* мають різні потреби в кисні, вони не вибагливі до поживних субстратів і можуть розвиватися на білкових і синтетичних середовищах з амонійними солями або нітратами. *B. subtilis* може використовувати амоній, нітрат, амінокислоти, деякі пурини, сечовину,

					ДП 6222. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		18

сечову кислоту, алантоїн та пептиди в якості єдиного джерела азоту. Глутамін та аргінін є найкращими джерелами для швидкого росту [12].

B. subtilis та *B. licheniformis* потребують поживні середовища з набором солей, які забезпечують потреби вегетативних і спорулюючих бактерій в іонах Fe^{3+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Na^+ , Mn^{2+} [15].

B. subtilis та *B. licheniformis*, як і більшість представників роду *Bacillus*, є сапрофітами, що широко розповсюджені в природі [16].

Оскільки природнім середовищем існування *B. subtilis* та *B. licheniformis* є ґрунт, що містить широкий спектр вуглеводів та полісахаридів з мікроорганізмів, рослин та тварин, вони, відтак, можуть використовувати широкий спектр субстратів та володіють великою кількістю ферментів, що розкладають полісахариди [12].

Залежно від умов культивування бацили можуть окислювати субстрати за участю кисню повітря в процесі дихання або викликати бродіння [17].

Багато видів роду *Bacillus* можуть використовувати нітрат в якості акцептору електронів за відсутності кисню. *B. subtilis*, що тривалий час вважався строгим аеробом, здатний рости аеробно не лише з нітратом в якості акцептору електронів, але й, у деяких випадках, за використання бродіння при відсутності акцепторів електронів. Цей вид та його близькі родичі не можуть використовувати інші акцептори електронів, такі як диметилсульфоксид, фумарат, триметиламін N-оксид. *B. subtilis* знаходиться в проміжному положенні між істинними факультативними анаеробами *Raenibacillus* та аеробами групи *Bacillus sphaericus*. Штами виду *B. licheniformis* можуть зброджувати вуглеводи за відсутності екзогенних акцепторів електронів.

В залежності від використаних субстратів, метаболізм бактерій роду *Bacillus* можна поділити на строго дихальний, строго бродильний або дихальний і бродильний одночасно. Як вже було сказано, деякі представники здатні отримувати енергію за рахунок нітратного дихання. Для більшості представників роду *Bacillus* характерно бродіння з утворенням 2,3-

					ДП 6222. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		19

бутандіолу, гліцерину і CO_2 , а також невеликих кількостей молочної кислоти і етанолу [18].

B. subtilis використовує піруватдегідрогіназу для перетворення пірувату в ацетил-кофермент А в анаеробних, а також в аеробних умовах і бродіння стимулюється піруватом. Таке бродіння відноситься до змішаного кислотно-бутандіолового типу, а продукти включають ацетат, ацетоїн, 2,3-бутандіол, етанол та лактат. *B. licheniformis* також здійснюють змішане бродіння. Під час нітратного дихання *B. subtilis* відновлює нітрати до нітритів та амонію, і, на відміну від денітрифікатору *B. licheniformis*, не виділяє газоподібних продуктів NO , NO_2 та N_2 . *B. licheniformis* демонструє слабкий анаеробний ріст на фумараті, він може рости в присутності аргініну з використанням шляху аргініндезамінази [12].

У бактерій *B. subtilis* до клітинних стінок входять мукопептиди, полісахариди, тейхоеві кислоти. Полісахариди і тейхоеві кислоти пов'язані з каркасом стінок – муреїном, або пептидогліканом. Полісахаридний скелет молекули представляє собою залишки N-ацетилглюкозаміну і N-ацетилмурамової кислоти, що чередуються та з'єднані між собою β -1,4-глікозидними зв'язками [19]. Тейхоева кислота складається з рибітолфосфату або гліцеролфосфату [20].

У *Bacillus licheniformis* окрім тейхоевих кислот у складі клітинної стінки було виявлено тейхуронові кислоти [12]. Тейхуронова кислота складається з довгих ланцюжків глюкуронової кислоти та N-ацетилгалактозаміну, що чергуються та пов'язані між собою 1,3-глікозидним зв'язком [20].

При необхідних живленні, температурі, рН і інших умовах клітини бактерій роду *Bacillus* будуть рости та ділитися бінарним поділом, при якому роздільна перегородка буде проходити по середині клітини.

Ендоспори утворюються в кінці фази експоненціального росту і процесу їх утворення сприяють, по меншій мірі, два види факторів навколишнього середовища. Відтак, першим впливовим фактором, що сприяє індукції споруляції, є збідніння субстрату, що супроводжується недоліком джерел

					ДП 6222. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		20

вуглецю, азоту, фосфору. Багато факторів впливають на формування ендоспор, зокрема, температура росту, рН поживного середовища, аерація, присутність окремих мінералів. Другим впливовим фактором є щільність біомаси.

Вегетативні клітини діляться симетрично і утворюють дві однакові клітини у той час як при споруляції поділ клітин відбувається асиметрично. При споруляції утворюються дві клітини, що мають зовсім різний вигляд: маленька спора, що є попередником майбутньої ендоспори, та велика материнська клітина [12].

Проведений аналіз [21] виявив, що у 24 з 42 природніх штамів було знайдено плазмід. Серед 22 виділених з пасовищ природніх штамів *B. licheniformis* 14 штамів містили одну або декілька плазмід різного розміру [22].

B. subtilis продукує велику кількість позаклітинних ферментів, серед яких 6 різноманітних протеаз, α -амілаза, левансахараза, декілька β -глюконаз і якнайменш два різні ліполітичних ферменти [23], ліпаза, пулуланази та ксиланази [24].

B. licheniformis також продукує багато позаклітинних ферментів – α -амілазу, глюкоамілазу, протеазу, пектиназу та целюлазу [25].

Деякі природні штами *B. subtilis* є стійкими до антибіотиків таких як хлорамфенікол, тетрациклін, рифампіцин та стрепоміцин [26] та стійкими до бактеріофагів за рахунок дефіциту глюкозованої тейхоевої кислоти та варіації типів тейхоевої кислоти у різних штамів [27]. Досліджені природні штами *B. licheniformis* мали гени стійкості до еритроміцину, стрептоміцину, хлорамфеніколу [28].

Селективними середовищами для аеробних спороутворюючих бактерій *Bacillus spp.* у мезофільному та нейтрофільному діапазоні є MEYP (Mannitol Egg Yolk Polymyxin agar) та PEMBA (Polymyxin Egg yolk Mannitol Bromothymol blue Agar). Для забезпечення достатнього рівня селективності середовища доводять до певних значень рН або інкубують при певних

					ДП 6222. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		21

температурах. Проте, навіть при дотриманні необхідних умов, на означених селективних середовищах можна очікувати появу різних видів бактерій роду *Bacillus*, а не окремих видів [29].

Також використовуються: середовище Гаузе №2 для виявлення антагоністичної активності; середовище Ендо – для контролю відсутності патогенних та умовно-патогенних бактерій кишкової групи; середовище Сабуро – для контролю відсутності грибів; середовище з сечовиною – для контролю відсутності бактерій роду *Proteus*; жовтково-солоний агар Чистовича – для контролю відсутності стафілококів [30].

Для технологічного процесу обрано середовище на основі кукурудзяного борошна, крохмалю, крейди та сульфату амонію, яке задовольняє поживні потреби продуцентів і є відносно дешевим.

1.6 Фактори патогенності

Зважаючи на те, що переважна кількість пробіотичних штамів мікроорганізмів входять до складу нормальної мікрофлори організму людини або присутні у харчових продуктах, які прийнято споживати декількома поколіннями людей у всьому світі, ВООЗ (Всесвітня Організація Охорони Здоров'я) та “Управлінням з контролю за харчовими продуктами та лікарськими препаратами США” було прийнято вважати певні пробіотичні мікроорганізми загалом безпечними та присвоєно їм “GRAS-статус” (Generally Regarded As Safe), який дозволяє використовувати препарати без обмеження у харчовій та фармацевтичній промисловості [31].

Статус GRAS було присвоєно управлінням контролю за продуктами харчування і ліками (FDA) лише тим видами роду *Bacillus*, які являються продуцентами ферментів, та не розповсюджується на використання їх у якості пробіотиків [32].

У літературі присутні лише одиничні повідомлення про наявність факторів патогенності у деяких штамів *B. subtilis*, які, втім, не є постійною ознакою, оскільки зникають при пересівах [33].

					ДП 6222. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		22

1.7 Поширення в природі

Бактерії виду *B. licheniformis* (розповсюджена ненаукова назва – «картопляна паличка») широко розповсюджені у особливо багатих на органічні речовини ґрунтах та багатьох інших середовищах, включаючи молоко та інші продукти харчування, а також вони були знайдені у клінічних та ветеринарних зразках біологічних рідин і продуктів життєдіяльності людини та тварин. Вегетативний ріст може легко відбуватися в продуктах, що зберігаються за 30-50 °C [12,16].

Ендоспори *B. subtilis* (розповсюджена ненаукова назва – «сінна паличка») дуже широко розповсюджені у ґрунті, пилі і рослинності, а також у багатьох інших середовищах. Вегетативні форми *B. subtilis* приймають участь у ранніх стадіях розпаду органічних речовин. Їх було знайдено у ґрунті, шлунково-кишковому тракті жуйних тварин та людини [12].

Кількість бацил у свіжеприготованих салатах складає 10^6 КУО/г, а через 24 години зберігання при 8 °C їх кількість зростає до 10^8 КУО/г.

Усе це свідчить про те, що контакт людини з цими бактеріями протікав впродовж тисячоліть. Бацили були знайдені у кристалах солі, вік яких складає 250 мільйонів років.

Отже, є привід стверджувати, що у травний тракт і дихальні шляхи людини, регулярно, впродовж всього періоду існування її як біологічного виду, потрапляла значна кількість бактерій роду *Bacillus*. В середньому сумарна кількість мікробних клітин бацил, що потрапляють в організм людини з оточуючого середовища становить $2 \times 10^7 - 5 \times 10^8$. Незважаючи на такий широкомасштабний контакт людини з аеробними спороутворюючими бактеріями, немає ніяких повідомлень про спонтанні або епідемічні захворювання, що викликалися б цими мікроорганізмами, що підтверджує їх безпечність для використання у складі біопрепарату [34].

					ДП 6222. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		23

РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА

2.1 Характеристика кінцевого продукту

Біоспорин відноситься до групи засобів для лікування гострих кишкових інфекцій та профілактики антибіотикоасоційованих дисбіозів – біопрепаратів-пробіотиків, основу яких складають живі мікробні культури [35].

Пробіотики – це мікроорганізми, які при природньому способі введення в організм здійснюють позитивний вплив на фізіологічні, біохімічні та імунні реакції організму людини за рахунок стабілізації та оптимізації функцій нормального мікробіоценозу кишечника. До цієї групи препаратів відносять апатогенні бактерії, що володіють антагоністичною активністю по відношенню до патогенних й умовно-патогенних мікроорганізмів та забезпечують відновлення у людини нормальної мікрофлори. Дія пробіотиків базується не лише на корекції мікрофлори, а й на імуномодуючій активності та участі в обміні речовин.

Пробіотичні препарати також назначають при позакишкових патологіях: ГРВІ, інфекційному моноклеозі, atopічному дерматиті, при вторинному імунодефіциті, при підготовці до вакцинації, для оптимізації фізичного розвитку тощо. Виходячи з цього, на даний момент, пробіотики та пробіотичні продукти використовують при: лікуванні захворювань, пов'язаних зі зміною мікрофлори; корекції дисбактеріозу кишечника у дітей та дорослих або бактеріального вагінозу у жінок; регуляції обмінних процесів в організмі шляхом підвищення активності метаболізму кишкової флори та власних обмінних процесів пробіотичних бактерій при колонізації кишечника. Пробіотики надають позитивний вплив на місцевий і системний імунітет, підсилюють протиінфекційний захист, чинять імуномодуючу

					ДП 6222. 00.000 ПЗ		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розробив		Юрченко Е.В.			РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА	Стадія	Аркуш
Консульт.						Д	24
						Аркушів	
						144	
Керівник		Ялабенко О. І.				КПІ ім. Ігоря Сікорського	
Затвер.						ФБТ	

дію.

Існує декілька класифікацій препаратів пробіотиків. За кількістю видів мікроорганізмів препарати-пробіотики поділяють на: монокомпонентні; монокомпонентні сорбовані пробіотики; полікомпонентні; комбіновані пробіотики.

За видовою належністю мікроорганізмів пробіотичні препарати поділяють на: біфідовмісні, лактовмісні, колівмісні, та такі, що складаються зі спорових бактерій і сахароміцетів, так звані антагоністи, що самоелімінуються.

Інша існуюча класифікація – поділ на чотири покоління, згідно появи відповідних препаратів у медичній практиці:

I покоління – класичні монокомпонентні препарати, що містять одиниц штам бактерій: Біфідумбактерин, Лактобактерин, Колібактерин;

II покоління – антагоністи, що самоелімінуються: Бактисубтил, Біоспорин, Споробактерин;

III покоління – комбіновані препарати, що складаються з декількох бактеріальних штамів або такі, що включають добавки, які підсилюють їх дію: Аципол, Біфіформ, Біфіліз, Лінекс, Ацилакт.

IV покоління – іммобілізовані на сорбенті живі бактерії – представники нормофлори. До них відносять сорбовані біфідовмісні пробіотики: Біфідумбактерин форте і Пробіфор.

Онiщенко Г.Г. звів дві класифікації – за видовим складом компонентів та загальній кількості видів мікроорганізмів у препараті (див. Табл. 2.1) [36].

					ДП 6222. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		25

Табл. 2.1

Класифікація пробіотичних препаратів

Монокомпонентні	
Біфідовмісні	Біфідумбактерин
Лактовмісні	Лактобактерин, Біобактон, Лактобацил, Нутролін
Колівмісні	Колібактерин, Мутафлор
Спороутворюючі (антагоністи, що самоелімінуються)	Ентерол, Бактисубтіл, Споробактерин, Бактиспорин, Біоспорин
Полікомпонентні	
Біфілонг, Біфікол, Окарин, Ацилакт, Лінекс, Біфідин, Біфінорм	
Комбіновані (синбіотики)	
Біфідумбактерин форте, Біфіліз, Біфіформ, Бактистатин, Примадофіліус, Полібактерин, Пробіфор, Кипацид, Аципол	
Рекомбінантні (генно-інженерні)	
Субалін	

Біоспорин випускається у формі капсул, саше та флаконів і містить ліофілізовані живі клітини [37]. У межах даної роботи розглядається кінцева форма продукту, що випускається у флаконах та використовується у медичній практиці як профілактичний засіб, являючи собою дієтичну добавку та використовується у медичній практиці.

Бактерії роду *Bacillus*, що входять до складу пробіотичного препарату, мають виражену профілактичну та терапевтичну активність при різноманітних інфекційних та неінфекційних захворюваннях. Лікувальна дія препаратів, що містять у своєму складі бактерії роду *Bacillus*, обумовлена їх вираженими антагоністичними властивостями по відношенню до широкого спектру патогенних та умовно-патогенних бактерій. Мікроорганізми, що входять до складу цих препаратів, синтезують ферменти, які стимулюють

травлення. Завдяки протеолітичним та фібринолітичним ферментам препарати бактерій можуть сприяти очищенню ран та джерел запалення від некротичних тканин. Найважливішими властивостями деяких штамів бацил є їх антиалергічна та антитоксична дія.

Переваги препаратів, що містять бактерії роду *Bacillus* – це їх нешкідливість для організму, навіть в концентраціях, що значно перевищують рекомендовані для вживання. Властивістю деяких штамів є їхня здатність вагомо підвищувати неспецифічну резистентність макроорганізму. Такі препарати рекомендовано назначати для елімінації патогенних та умовно-патогенних бактерій з наступним використанням препаратів для повного відновлення порушеного мікробіоценозу [38].

Висока антагоністична активність штамів *B.subtillis* та *B.licheniformis* у складі препарату Біоспорин виявляється проти збудників кишкових інфекцій, серед яких *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, ентеропатогенні *E.coli*, *Proteus spp.*, *Campylobacter coli*, *C.jejuni*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Staphylococcus spp.*, *Candida spp.*, в тому числі полірезистентні. Спори, завдяки стійкості до кислого середовища шлунку, не змінюючи свій вигляд, проникають в кишечник і там перетворюються у вегетативні клітини. Мікробна активність бактерій роду *Bacillus* пов'язана з продукуванням близько 200 антибіотикоподібних речовин та активним продукуванням комплексів ферментів, здатних до стимулювання і регулювання процесу травлення, таким чином сприяючи кращому засвоєнню їжі, амінокислот, зокрема незамінних, а також стимулюванню захисних реакції людського організму.

Саме завдяки елімінації патогенних та умовно-патогенних бактерій, грибкової флори та позитивним впливам на стан загального і місцевого імунітету, цитопротекторним властивостям по відношенню до слизового бар'єру кишечника Біоспорином створюються умови для відновлення індивідуальної фізіологічної мікробіоти кишечника. Індивідуальна

					ДП 6222. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		27

фізіологічна мікробіота кишечника людини нормалізується за якісним та кількісним складом.

Біоспорин рекомендовано вживати і як дієтичну добавку до раціону харчування у якості джерела активних культур *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* для дорослих та дітей від народження [37].

2.2 Метаболізм вуглеводів та продукти конструктивного метаболізму пробіотичних мікроорганізмів

Bacillus subtilis та *B. licheniformis* можуть використовувати цукри або органічні кислоти в якості джерел вуглецю та енергії. Ці поживні речовини метаболізуються гліколізом з наступним циклом Кребсу та пентозофосфатним шляхом. Якщо *B. subtilis* та *B. licheniformis* забезпечуються сукцинатом та глутаматом, в доповнення до глюкози, то клітини, відповідним чином, корелюють свій метаболізм. Цей феномен було виявлено за допомогою аналізу транс криптного та метаболічного потоку. Частина глюкозо-6-фосфату, що надходить до пентозофосфатного шляху, значно збільшується у присутності органічних кислот. Так само, важливі зміни виявлено на за дії пірувату та ацетил-коферменту А (ацетил-КоА). В присутності органічних кислот утворення оксалоацетату сильно знижується, оскільки утворення лактату значно збільшується. Оперон *alsSD*, що необхідний для утворення ацетоїну, індукується в присутності органічних кислот, однак утворення ацетоїну не спостерігається. Фосфорилування ацетолактатдекарбоксилази може забезпечити додатковий рівень контролю метаболізму. В присутності органічних кислот ацетил-КоА перетворюється на ацетат, а не використовується для живлення циклу Кребса [39].

B. subtilis та *B. licheniformis* можуть використовувати, принаймні, два десятки різних моно- або дисахаридів, в якості єдиного джерела вуглецю та енергії. Загальна схема утилізації вуглеводів включає в себе транспорт речовин у клітину, фосфорилування та наступний катаболізм через гліколіз або пентозофосфатний шлях [40].

					ДП 6222. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		28

Розбіжність шляхів окислення вуглеводів – гліколітичного і пентозофосфатного – починається зі стадії утворення гексозомонофосфату.

Якщо глюкозо-6-фосфат ізомеризується у фруктозо-6-фосфат, який фосфорилується вдруге і перетворюється у фруктозо-1,6-бісфосфат, то в цьому випадку подальший розпад вуглеводів відбувається за звичайним гліколітичним шляхом з утворенням піровиноградної кислоти, яка, окислюючись до ацетил-КоА, потім «згоряє» в циклі Кребса.

Якщо другого фосфорилування гексозо-6-монофосфату не відбувається, то фосфорильованна глюкоза може піддаватися прямому окисненню до фосфопентози.

Пентозофосфатний цикл (див. Рис. 2.1) починається з окислення глюкозо-6-фосфату і подальшого окисного декарбоксилювання продукту (в результаті від гексозофосфату відщеплюється перший атом вуглецю), що є першою окислювальною стадією. Друга стадія включає неокислювальне перетворення пентозофосфатів з утворенням вихідного глюкозо-6-фосфату [41].

					ДП 6222. 00.000 ПЗ	Арк.
						29
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

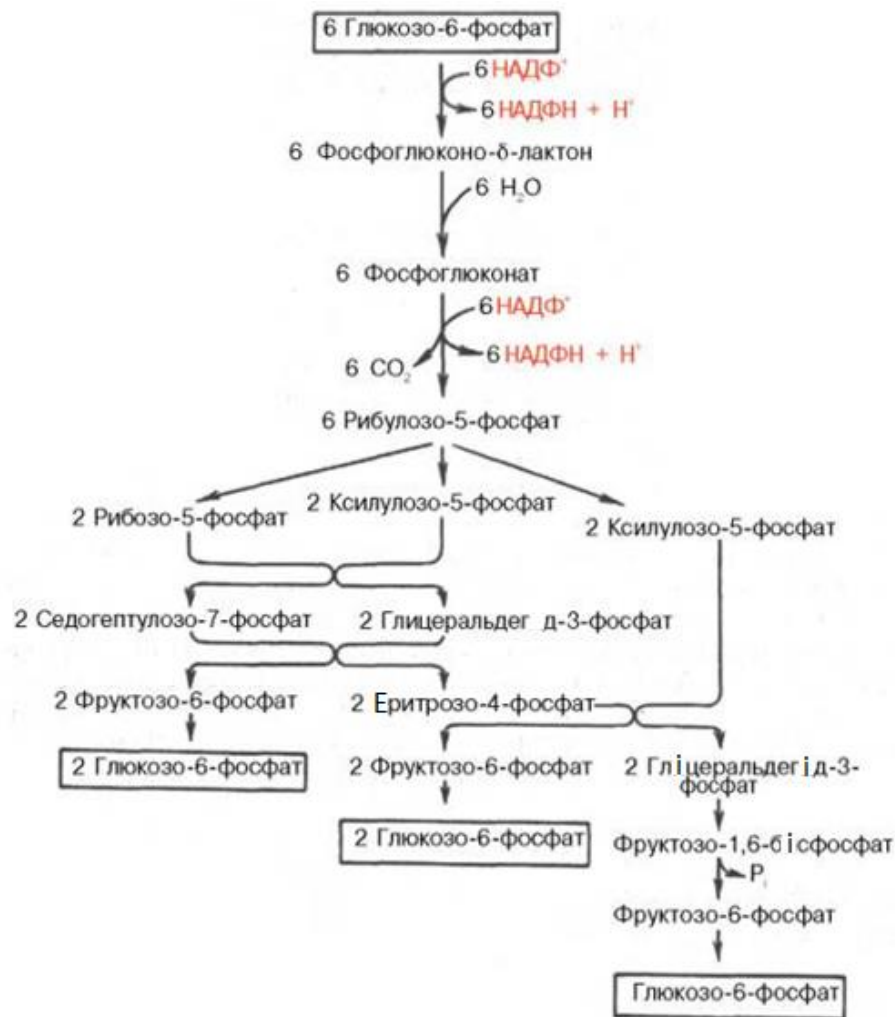


Рис. 2.1 Окислення вуглеводів пентозофосфатним шляхом [41]

Перша реакція – дегідрування глюкозо-6-фосфату за участю ферменту глюкозо-6-фосфатдегідрогенази і коферменту НАДФ⁺. В ході реакції утворюється 6-фосфоглюконо-δ-лактон – нестабільна сполука, що швидко гідролізується або спонтанно, або за допомогою ферменту 6-фосфоглюконолактонази з утворенням 6-фосфоглюконової кислоти. У другій окисній реакції, що каталізується 6-фосфоглюконатдегідрогіназою, 6-фосфоглюконат дегідрується і декарбоксилюється. Утворюються фосфорильована кетопентоза – D-рибулозо-5-фосфат і 1 молекула НАДФН. Під дією епімерази з рибулозо-5-фосфату може утворитися інша фосфопентоза – ксилулозо-5-фосфат. Крім того, рибулозо-5-фосфат, під впливом особливої ізомерази, легко

перетворюється в рибоза-5-фосфат. Між цими формами пентозофосфатів встановлюється стан рухої рівноваги.

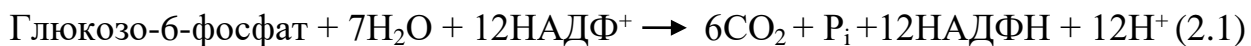
За певних умов пентозофосфатний шлях на цьому етапі може завершитися. Однак, при інших умовах, настає, так званий, неокислювальний етап пентозофосфатного циклу. Реакції цього етапу не пов'язані з використанням кисню і протікають в анаеробних умовах. При цьому, утворюються речовини, характерні для першої стадії гліколізу (фруктозо-6-фосфат, фруктозо-1,6-бісфосфат, фосфотріози), та інші – специфічні для пентозофосфатного шляху (седогептулозо-7-фосфат, пентозо-5-фосфати, еритроза-4-фосфат).

Основними реакціями неокислювальної стадії пентозофосфатного циклу є транскетолазна і трансальдолазна. Ці реакції каталізують перетворення ізомерних пентозо-5-фосфатів. Коферментом в транскетолазній реакції є ТПФ. В результаті, утворюється седогептулозо-7-фосфат і гліцеральдегід-3-фосфат, і це є першою реакцією. Транскетолазна реакція в пентозному циклі зустрічається двічі, вдруге – при утворенні фруктозо-6-фосфату і тріозофосфату, в результаті взаємодії другої молекули ксилулозо-5-фосфату з еритроза-4-фосфатом. Фермент трансальдолаза каталізує перенесення залишку діоксіацетону від седогептулозо-7-фосфату на гліцеральдегід-3-фосфат.

Шість молекул глюкозо-6-фосфату, вступаючи в пентозофосфатний цикл, утворюють 6 молекул рибулозо-5-фосфату і 6 молекул CO_2 , після чого з 6 молекул рибулозо-5-фосфату знову регенерується 5 молекул глюкозо-6-фосфату. Однак, це не означає, що молекула глюкозо-6-фосфату, що вступає в цикл, повністю окислюється. Всі шість молекул CO_2 утворюються з першого атому вуглецю шести молекул глюкозо-6-фосфату.

					ДП 6222. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		31

Сумарне рівняння (2.1) окисної і неокисної стадій пентозофосфатного циклу можна представити в наступному вигляді [41]:



Гліколіз протікає без участі кисню. Стадії гліколізу представлені на Рис 2.2. Даний метаболічний шлях складається з 11 стадій, кожна з яких показана на рисунку вертикальною стрілкою і являє собою відповідну реакцію [42].

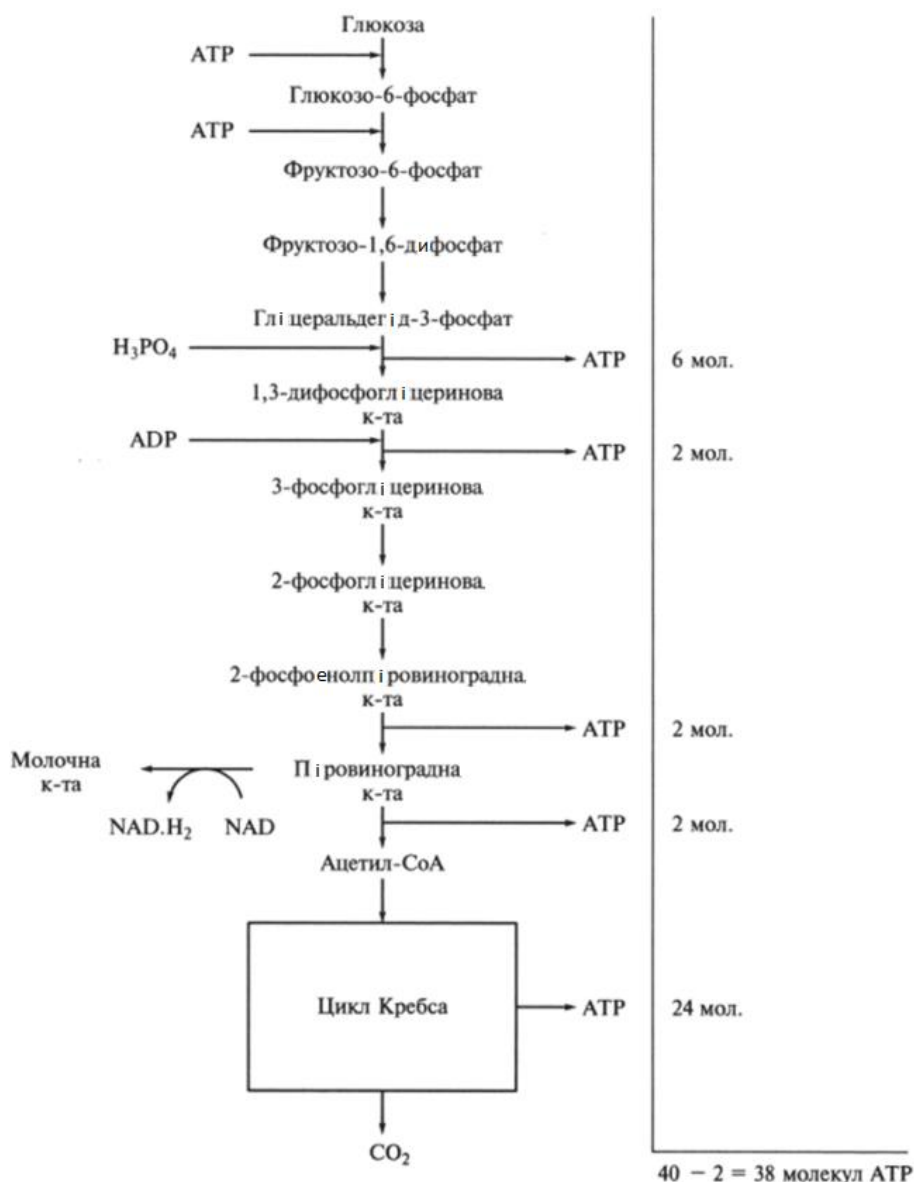


Рис. 2.2 Гліколіз [42]

Фосфорилування глюкози є першою реакцією метаболічного шляху, яка проходить за участю АТФ. Наступною йде реакція ізомеризації фруктозо-6-фосфату, де відбувається перетворення альдегіду в кетон. За витрати ще однієї молекули АТФ відбувається фосфорилування фруктозо-6-фосфату. Розщеплення 6-вуглецевого скелету глюкози на 3-вуглецеві фрагменти (похідні гліцерину) призводить до утворення гліцеральдегід-3-фосфату. Далі слідує поступове перетворення 1,3-дифосфогліцеинової кислоти спочатку у 3-фосфогліцеинову кислоту та далі у 2-фосфогліцеинову кислоту, яка зрештою вступає в реакцію дегідратації. Високоенергетичний зв'язок фосфатного залишку розривається та відбувається синтез АТФ. Піровиноградна кислота перетворюється на ацетил-КоА і на молочну кислоту.

Реакції на кожній стадії каталізуються ферментами: на першій стадії – гексозокіназою; на другій – гексозо-6-фосфатізомеразою; на третій – 6-фосфоглюкокіназою; на четвертій – фруктозодифосфатацьдолазою; на п'ятій – тріозофосфатізомеразою; на шостій – гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогіназою; на сьомій – фосфогліцераткіназою; на восьмій – енолазою; на дев'ятій – піруваткіназою.

Сумарне рівняння реакцій гліколізу зображено на Рис. 2.3 [42]:



Рис. 2.3 Сумарне рівняння реакцій гліколізу [42]

Структурні компоненти утворених, в процесі біосинтезу, спорових та вегетативних клітин *B. subtilis* і *B. licheniformis* характеризується наступними

					ДП 6222. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		33

показниками (у % від вмісту в сухій масі): загальний азот – 75,97% і 63,54%; амінові цукри (в формі глюкозаміну) – 2,2% та 10,7%; мурамінова кислота – 0,6% і 0,2%; ефіророзчинні ліпіди – 1,4% і 0,7%; о-естерові групи – 0,027% і 0,255%; загальний фосфор – 1,4% та 4,2%; глюкозамін – 1,5% і 7,9%; діамінопімелінова кислота – 1,0% і 5,6%; загальні ліпіди – 3,0% і 2,3%; інші компоненти – 12,9% і 4,6% для спорових і вегетативних форм відповідно.

Оскільки кінцевою метою процесу культивування є отримання живої бактеріальної біомаси, то важливе значення мають компоненти та речовини, що утворюються в бактеріальній клітині в процесі конструктивного метаболізму.

В процесі росту бактерії роду *Bacillus* виділяють наступні біологічно-активні речовини:

- антибіотики: бацитрацин, бацилізин, бациломіцин, бацилін, граміцидин, ітурин, обутин, протицин, петрин, субтілін, токсиміцин, тріпанотоксин, флювоміцин, ендосубтілізин;
- ферменти: гідролази, оксидоредуктази, трансферази, ліази, лігази;
- амінокислоти: аланін, аспарагінова кислота, валін, гістидин, гліцин, глютамінова кислота, ізолейцин, лейцин, лізин, метіонін, орнітин, пролін, серин, тирозин, триптофан, треонін, фенілаланін;
- полісахариди: тейхоеві і тейхуронові кислоти, мукопептиди і гексозаміни.

Бактерії роду *Bacillus* продукують антибіотики 4 основних класів: циклічні олігопептиди (наприклад, бацитрацин), що впливають на біосинтез пептидоглікану та інгібують синтез стеролів; лінійні олігопептиди (наприклад, поліміксин), що діють на мембранні функції шляхом

вбудовування між ліпідами і білками мембранних структур мікроорганізмів, приводячи до незворотних змін; основні пептиди (наприклад, едеїни), що пригнічують синтез білка в рибосомах за рахунок пригнічення інформаційної РНК; аміноглікозидні антибіотики (наприклад, бутирозін), які мають здатність порушувати функціонування 30 S-субодиниці рибосоми і, таким чином, впливати на синтез білкових сполук.

Висока біохімічна активність бактерій роду *Bacillus* забезпечується набором різних ферментів, що володіють широкою субстратною специфічністю і, в першу чергу, гідролітичною: амінопептидаза, субтілопептидаза, плазмін, ксиланаза, фосфодіестераза, α -амілаза, α -амілаза k (α -1,4-глюкан 4-глюканогідролаза), дезоксирибонуклеаза, аргіназа, α -ацетилглюкозамінідаза, фосфатаза, фосфорилаза, β -галактозидаза, мальтаза (β -глюкозидаза), естераза, ламінараза, L-лактатдегідрогеназа, нітратредуктаза, циклодекстринглікозилтрансфераза, піруват-кіназа, лавансахараза, рибонуклеаза, транс-дегідратаза, пектатліаза, аконітат гідратаза (аконітаза), кетозо-1-фосфат-альдолаза (альдолаза).

Значна роль в забезпеченні метаболічних функцій у *B. subtilis* та *B. licheniformis* належить протеолітичним ферментам, які можуть бути як ендогенними, так і активно виділятися в культуральну рідину. Показана їх роль на різних етапах споруляції. Звертає на себе увагу і продукція вегетативними бактеріальними клітинами літичних ферментів, що здатні лізувати клітинні стінки різних видів бактерій, грибів і дріжджів. Бактерій роду *Bacillus* можуть також синтезувати, в порівняно високих концентраціях, такі ферменти, як α і β -амілази, глюкозидази і глюकोзоізомерази, які здатні розщеплювати полісахариди.

Вивчення аміносинтетичної активності штамів *B. subtilis* дозволило встановити, що більшість з них продукує від 4 до 16 амінокислот, а у 86% штамів показана можливість синтезу 9-14 амінокислот, 43% штамів цього

					ДП 6222. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		35

виду синтезує лізин; 21,5% – фенілаланін; 7% – цистин, метіонін, гістидин; 3,5% – триптофан.

Концентрація амінокислот, що виділяються в культуральну рідину, досягає таких величин (у мг/дм⁻³ сухого залишку): лізин – 52, триптофан – 21, треонін – 15, метіонін – 12, гістидин – 22, валін – 25, ізолейцин – 23, лейцин – 48, фенілаланін – 22, аргінін – 24 [43].

Встановлено, що потреби аеробних спороутворюючих бактерій в амінокислотах значно відрізняються для різних штамів, в тому числі і для *B. subtilis* і *B. licheniformis*. Для випробуваних штамів *B. subtilis* та *B. licheniformis*, було встановлено, що вони не є ауксотрофами по відношенню до будь-якої з 20 амінокислот, що містяться в випробуваних ПС (поживних середовищах) [44].

Що стосується здатності пробіотичних штамів бацил синтезувати вітаміни, то, в ході досліджень, у них виявлені такі вітаміни, як В₆ (2-5 мг/дм⁻³), В₁₂ (50- 60 мг/дм⁻¹), рибофлавін, тіамін, нікотинова і пантотенова кислоти.

Концентрація нуклеїнових кислот в сухому залишку коливається і знаходиться в діапазоні (0,3-0,5) – (2,0-3,0) мкг·г⁻¹, що, в основному, залежить від якісного складу поживних середовищ і технологічних особливостей процесу виділення.

Метаболіти мають високу бактеріостатичну, бактерицидну і імунобіологічну активність і тому використання супернатантів є перспективними для створення, на їх основі, пробіотиків нового покоління [43].

Інтенсивність процесів спороутворення залежить від наявності в ПС мінеральних солей, що містять іони Ca, Mg, K, Mn, Fe, Zn, Cu та інших металів. За відсутності деяких з них, перш за все Ca, Mg, Mn спороутворення відбувається повільно або ж взагалі не спостерігається. В процесі

					ДП 6222. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		36

спороутворення у *B. subtilis* іон марганцю, необхідний як кофактор фосфатгліцеромутази, що є ферментом, який бере участь в процесі споруляції. Катіони Na, Ca, Mg, K, Li, Zn впливають на синтез екзопротеази і спороутворення у *B. licheniformis*. Катіони, нейтралізуючи поверхневий негативний заряд на мембрані цитоплазми, регулюють утворення екзопротеази і спороутворення *B. licheniformis*.

Однією з умов спороутворення для описуваних бактерій є недостатність джерел азотного живлення, при достатній кількості інших необхідних компонентів ПС. Для спороутворюючих бактерій *B. subtilis* і *B. licheniformis* важливе значення мають показники початкового рН та буферної ємності ПС, тому, що в процесі культивування в перші 12 год відбувається значне закислення ПС. У разі якщо це закислення перевищує певну величину рН, то часто спостерігається негативний вплив на спорогенез. Включення до складу середовищ буферних розчинів на основі солей калію і фосфору також призводить до незадовільного спороутворення, причиною якого є включення в метаболізм P^{5+} і K^{+} [44].

Розвиток і спороутворення у мікроорганізмів значною мірою визначаються вибором оптимального режиму аерації в ферментері. Умови аерації в ферментерах визначаються оптимальною комбінацією двох факторів аерації: об'ємом повітря, що подається і ефективністю роботи пристроїв, (швидкістю обертання мішалки, її конструктивними особливостями, інтенсивністю перемішування рідини й дробленням бульбашок повітря). Однак, в реальних умовах виробництва, збільшення кількісних характеристик цих факторів має певні обмеження внаслідок високого піноутворення і можливості пошкодження бактерій. Для спороутворення необхідне підвищення як швидкості обертання мішалки, так і подачі повітря, в період вегетації і початкових етапів споруляції з подальшим їх зменшенням [44].

					ДП 6222. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		37

Встановлено, що споруляція настає слідом за експонентною фазою зростання, коли наявне лімітування поживних речовин в середовищі, зокрема, глюкози. У цей період спорулюють тільки ті клітини, в яких закінчився цикл синтезу ДНК. Для отримання спор зазвичай застосовують два методи: використання для культивування «бідного», за складом, ПС, що містить близько 0,03 г/дм³ азоту і перенесення експонентно зростаючої культури з «багатого» ПС на «бідне».

Температура вирощування бактерій є важливою складовою умовою спороутворення, яка визначає швидкість метаболізму і тривалість власне культивування. Глибинне культивування *B. subtilis* і *B. licheniformis* здійснюють при 37°C.

Важливе значення для отримання однорідної популяції спор, а також тривалості культивування має якість посівного матеріалу. Для культивування спороутворюючих бактерій прийнятні два типи робочих посівних культур: спорові і вегетативні. Як посівні культури *B. subtilis* і *B. licheniformis* використовуються вирощені на середовищі Гаузе № 2 в біологічних матрацах спорові матеріали. Термоактивовані спорові культури мають мінімальну гетерогенність, що забезпечує синхронізацію зростання і розвитку мікроорганізмів [44].

2.3 Характеристика компонентного складу біотехнологічного препарату, отриманого в процесі реалізації технології

Кінцевий продукт являє собою ліофільно висушений порошок для приготування розчину у скляних флаконах. Одна упаковка Біоспорину містить 10 флаконів.

Склад на 1 флакон: спори і живі мікробні клітини *B. subtilis* УКМ В-5007 та *B. licheniformis* УКМ В-5514 – не менше $1,1 \times 10^9$ КУО; допоміжні речовини: сахароза, желатин, сухе знежирене молоко [37]. У складі

					ДП 6222. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		38

пробіотичного препарату наявні два природні штами бацил, при цьому частина живих бацил (не менш як 50 %) перебуває у споровій формі, а співвідношення штамів *B. subtilis* та *B. licheniformis* становить 3:1, що забезпечує максимальну ефективність препарату [38].

Роль сахарози, желатини та сухого знежиреного молока, що присутні у складі препарату, полягає у їхніх захисних властивостях при сублімаційному висушуванні біомаси. У готовому продукті сахароза може виступати як кориген смаку, надаючи йому солодкуватий присмак. Оскільки сухе знежирене молоко може викликати у сприйнятливих людей алергічну реакцію або погіршувати самопочуття, на упаковці та етикетці, у місці наведення складу, цей компонент має бути виділено жирним шрифтом. Масова частка вологи у готовому продукті складає 3-4%.

Сахароза по якості має відповідати вимогам ГОСТ 5833-75, желатина – ГОСТ 11293-89. Якість молока сухого знежиреного визначається всіма вимогами, описаними в ГОСТ 10970-87.

Мікробіологічна чистота: чиста культура, препарат не повинен містити сторонньої мікрофлори, в тому числі пліснявих та дріжджоподібних грибів [38].

2.4 Механізми впливу цільового продукту на біохімічні процеси

Потрапляючи в організм людини, мікробні клітини починають функціонувати, надаючи пряму бактерицидну дію стосовно патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів, що було перераховано у підрозділі 2.1, і опосередковану – шляхом активації специфічних і неспецифічних систем захисту макроорганізму.

Пробіотичний препарат, за рахунок індукції ендогенного інтерферону, стимуляції фагоцитарної активності лейкоцитів крові, а також синтезу імуноглобулінів, позитивно впливає на імунну систему людини, підвищуючи неспецифічну резистентність до інфекційних захворювань (включаючи кишкові інфекції бактеріальної та грибової природи).

					ДП 6222. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		39

Бактеріальні клітини пробіотичного препарату активно продукують ферменти, амінокислоти, антибіотичні речовини та інші фізіологічно активні сполуки, беручи участь в травленні і доповнюючи комплексну лікувально-профілактичну дію препарату [36].

Біоспорин має виражену антиалергічну і протитоксичну дію. Ці ефекти пояснюються як імуномодуючими властивостями, так і синтезом мікроорганізмами ряду замінних і незамінних амінокислот, вітамінів, ферментів (протеїнази, амілази, ліпази, целюлази тощо) та інших біологічно активних речовин в кишечнику, які асимілюються макроорганізмом. Біоспорин також сприяє зменшенню або повному припиненню утворення і всмоктування в шлунково-кишковому тракті продуктів гнильного бродіння за рахунок підвищення ферментолізу їжі і її засвоюваності.

Відзначаючи різноманітні механізми лікувально-профілактичної дії препаратів з бацил, важко стверджувати, які з них є головними, а які – другорядними. При різних гострих і хронічних захворюваннях шлунково-кишкового тракту, терапевтична дія в одних випадках може досягатися переважно за рахунок антагоністичних властивостей бацил, в других – за рахунок продукції ними ферментів, в інших – за рахунок активації захисних реакцій. Вважається, що участь в процесі одночасно приймають кілька факторів.

Отже, лікувально-профілактична дія Біоспорину обумовлена комплексом його властивостей, що впливають як на макроорганізм в цілому, так і на патогенну і умовно-патогенну мікрофлору [36,45].

Препарат володіє широким спектром антагоністичної дії. Це пов'язано з тим, що, крім високих концентрацій мікроорганізмів в терапевтичній дозі ($1,1 \times 10^9$ КУО), не менше 50% мікроорганізмів представлені у вигляді спорової форми бактерій. Останнє забезпечує високу виживаність в шлунку і в початкових відділах тонкої кишки з кислою реакцією середовища і вираженою ферментативною активністю. Крім того, препарат чинить додаткову антимікробну дію за допомогою “популяційного тиску” –

					ДП 6222. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		40

конкументного витіснення патогенних і умовно-патогенних бактерій з шлунково-кишкового тракту.

Відсутність антагонізму препарату в цілому та складових його мікроорганізмів, зокрема, по відношенню до нормальної мікрофлори шлунково-кишкового тракту людини, а також до бактерій, які є основою біфідум-, колі- та лактобактеринів, дозволяє використовувати Біоспорин для санації кишечника як самостійно, так і в поєднанні з відповідними біопрепаратами (наприклад, з Біфідумбактерином) при хронічних дисбактеріозах та інших розладах [36].

					ДП 6222. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		41

РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ

3.1 Генетична вивченість біологічного об'єкту

Геном багатьох штамів *B. subtilis* та *B. licheniformis* достатньо вивчено. Модельним об'єктом і найбільш вивченим з представників роду *Bacillus* є *B. subtilis*. Хромосома *B. licheniformis* містить великі ділянки, які є колінеарними з геномами *B. subtilis* та *B. halodurans*, і приблизно 80% прогнозованих послідовностей кодування *B. licheniformis* мають ортологи *B. subtilis*.

Геном *B. subtilis* налічує 4214810 основних пар і включає 4100 генів, що кодують білок. З цих генів, що кодують білки, 53% представлені тільки один раз, а чверть геному відповідає декільком родинам генів. Велика частка генетичної інформації присвячена здатності до використання бактерією різноманітних джерел вуглецю, включаючи безліч молекул рослинного походження. Ідентифікація п'яти генів сигнальної пептидази, а також кількох генів, що кодують компоненти секретійного апарату, важлива, враховуючи здатність штамів *Bacillus* виділяти велику кількість промислово важливих ферментів. Багато генів задіяно в синтезі вторинних метаболітів, включаючи антибіотики, які, як правило, асоціюються з видами роду *Streptomyces*. Геном містить щонайменше десять профагів або залишків профагів, що свідчить про те, що інфікування бактеріофагами та горизонтальне перенесення генів відіграло важливу еволюційну роль [46].

Початок реплікації збігається з початковою точкою нумерації, а кінець становить приблизно 2017 кілобаз. Середнє співвідношення G + C становить 43,5%, але воно значно варіюється вздовж хромосоми. Це середнє значення також відрізняється, якщо враховувати вміст нуклеотидів в кодуючих

					ДП 6222. 00.000 ПЗ		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ		
Розробив		Юрченко Е.В.					
Консульт.							
Керівник		Ялабенко О. І.					
Затвер.							
					Стадія	Аркуш	Аркушів
					Д	42	144
					КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		

послідовностях, для яких G і A (24% і 30%) відносно чисельніші, ніж їх аналоги C і T (20% і 26%). Значну інверсію відносного співвідношення $G - C = G + C$ видно на початку реплікації, що вказує на асиметрію нуклеотидного складу між ведучим ланцюгом реплікації та ланцюгом, що відстає. Деякі багаті на A + T островки, ймовірно, мають відношення до бактеріофагових лізогенів або інших вставних елементів [46].

Кругове представлення геному *B. subtilis* 168 за специфічними ознаками геному наведено на Рис 3.1.

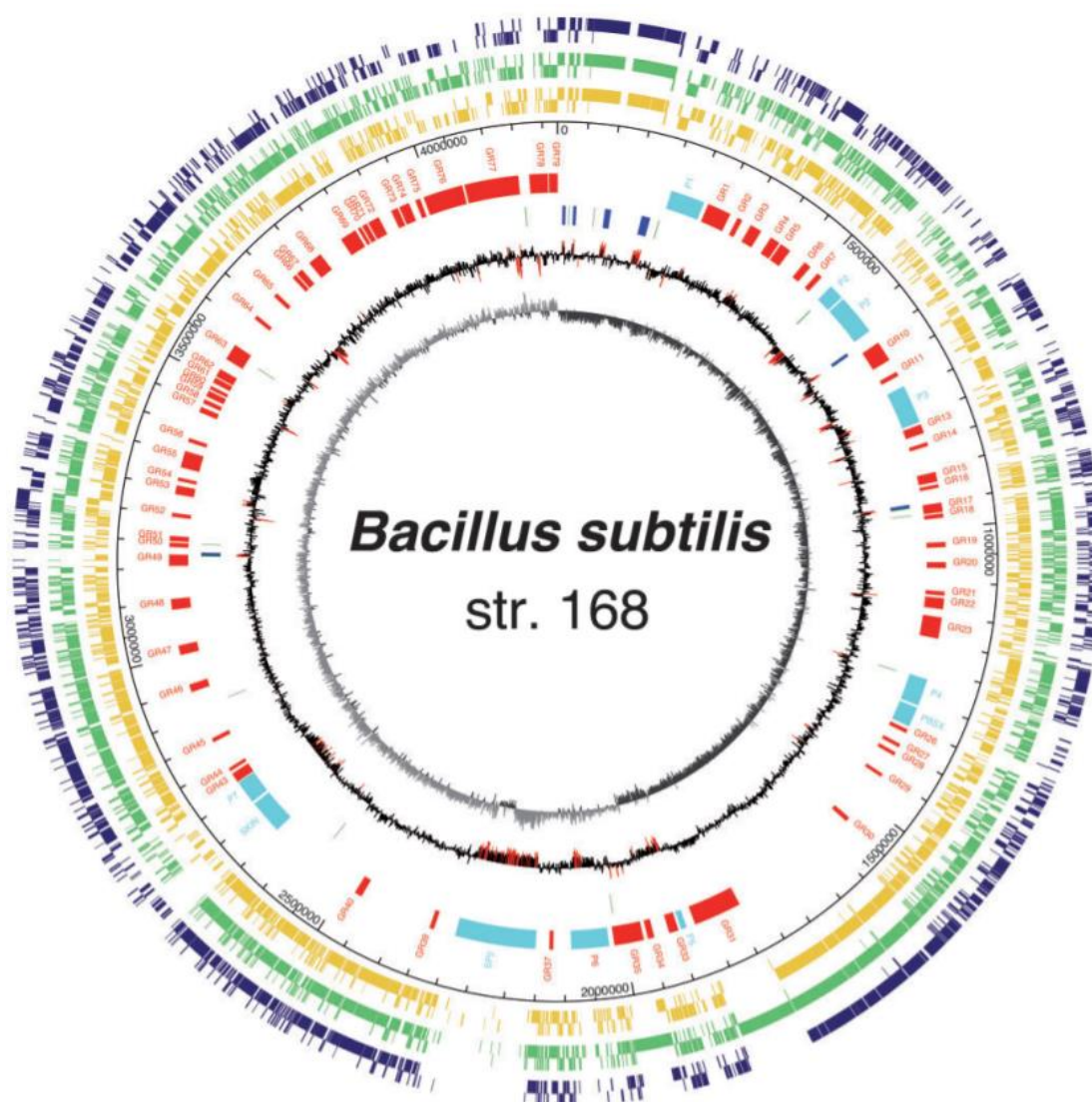


Рис. 3.1. Генетична карта хромосоми *B. subtilis* [46]

Рух по колам відбувається від внутрішнього кола до зовнішнього. Круг 1 відображає перекоп GC ($G + C / G - C$), а круг 2 – відхилення GC. Червоні

зони означають, що відхилення вище на 1,5 за стандартне відхилення. На крузі 3 тРНК позначено темно-зеленим кольором, а рДНК – синім. Круг 4 показує розташування геномних областей із специфічними ознаками, що відрізняють їх від середньої послідовності. Зони, пофарбовані в світло-блакитний колір, вказують на області фагового походження. Варто підкреслити несиметричний розподіл (права та ліва половини круга). Круг 5 має шкали (6, 7, 8), де означено гени, що мають передбачуваний ортолог у інших видів *Bacillus* (*B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* та *B. pumilus* відповідно) [47].

Ідентифіковано понад 4000 імовірних білок-кодуєчих CDS-послідовностей середнім розміром 890 пар основ, що охоплює 87% послідовності геному. 78% генів починаються з ATG, 13% – з TTG і 9% – з GTG.

CDS *B. subtilis* можна розділити на три чітко визначені класи. До класу 1 належить переважна кількість генів *B. subtilis* (3375 CDS), включаючи більшість генів, що беруть участь у споруляції. Клас 2 (188 CDS) включає гени, які сильно експресуються в умовах експоненціального росту, такі як гени, що кодують механізми транскрипції та трансляції, основний проміжний метаболізм, білки стресу. Третина генів цього класу має невідому функцію. Клас 3 (537 CDS) містить дуже високу частку генів з невстановленою функцією (84%), і члени цього класу мають кодони, збагачені А + Т залишками. Ці гени зазвичай кластеризовані в групи від 15 до 160 генів (наприклад, бактеріофаг SPb) і відповідають острівцям, багатим на А + Т. У випадку, коли вони мають відому функцію або коли їхні продукти є схожими з білками з відомою функцією, вони, зазвичай, відповідають функціям, знайденим у бактеріофагів або транспозонів, а також функціям, що стосуються оболонки клітини. Багато з цих генів пов'язані з генами вірулентності, що виявлені в патогенних грампозитивних бактерій, що дозволяє припустити, що такі фактори вірулентності передаються горизонтально серед бактерій з високою частотою.

					ДП 6222. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		44

Якщо розглянути ці багаті на А + Т області як можливі криптичні фаги разом з відомими бактеріофагами або бактеріофагоподібними елементами (SPb, PBSX та елемент шкіри), то виявиться, що геном *B. subtilis* 168 містить щонайменше 10 таких елементів. Анотація відповідних областей часто виявляє присутність генів, схожих на літичні ферменти бактеріофагів, пояснюючи спостереження, що культури *B. subtilis* надзвичайно схильні до лізису.

Гени рибосомальної РНК організовані в десять оперонів рРНК, які в основному згруповані біля початку реплікації хромосоми [46,47].

Геном *B. licheniformis* розглянемо на прикладі штаму ATCC 14580. Геном *B. licheniformis* складається з кільцевої хромосоми, яка має 4222336 пар основ з середнім вмістом G (гуанін) + C (цитозин) пар – 46,2%. До складу геному *B. licheniformis* ATCC 14580 входить 4 208 гени, що кодують білки, середнього розміру – 873 пар основ, сім оперонів рРНК та 72 генів тРНК. Під час аналізу геному досліджуваного штаму *B. licheniformis* ATCC 14580 плазмиди не були виявлені [48].

За використання комбінації декількох програм для пошуку генів виявлено наявність 4208 білок-кодуючих послідовностей (CDS). Ці CDS складають 87% геному та мають середню довжину 873 пар нуклеотидів (від 78 до 10767 п.н). У хромосомі вони орієнтовані в основному у напрямку реплікації – у ведучому ланцюзі 74,4% генів та 25,6% – у відстаючому. Серед 4208 генів, що кодують білок, 3948 (94%) мали значну схожість з білками в базі даних PIR (Protein Information Resource), 3187 (76%) з цих моделей генів містять подібні, знайдені у Interpro, а 2895 (69%) мають схожість з білками, що знайдені в програмі Pfam.

Число гіпотетичних і консервативних гіпотетичних білків в геномі *B. licheniformis* з потрапляннями в базу даних PIR складає 1318 (212 консервативних гіпотетичних білків). Серед списку гіпотетичних і консервативних гіпотетичних генних продуктів 683 (52%) мають, згідно

					ДП 6222. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		45

програми Pfam, білкові подібності. Генوم *B. licheniformis* ATCC 14580 містить 72 гени тРНК, що представляють всі 20 амінокислот та сім оперонів.

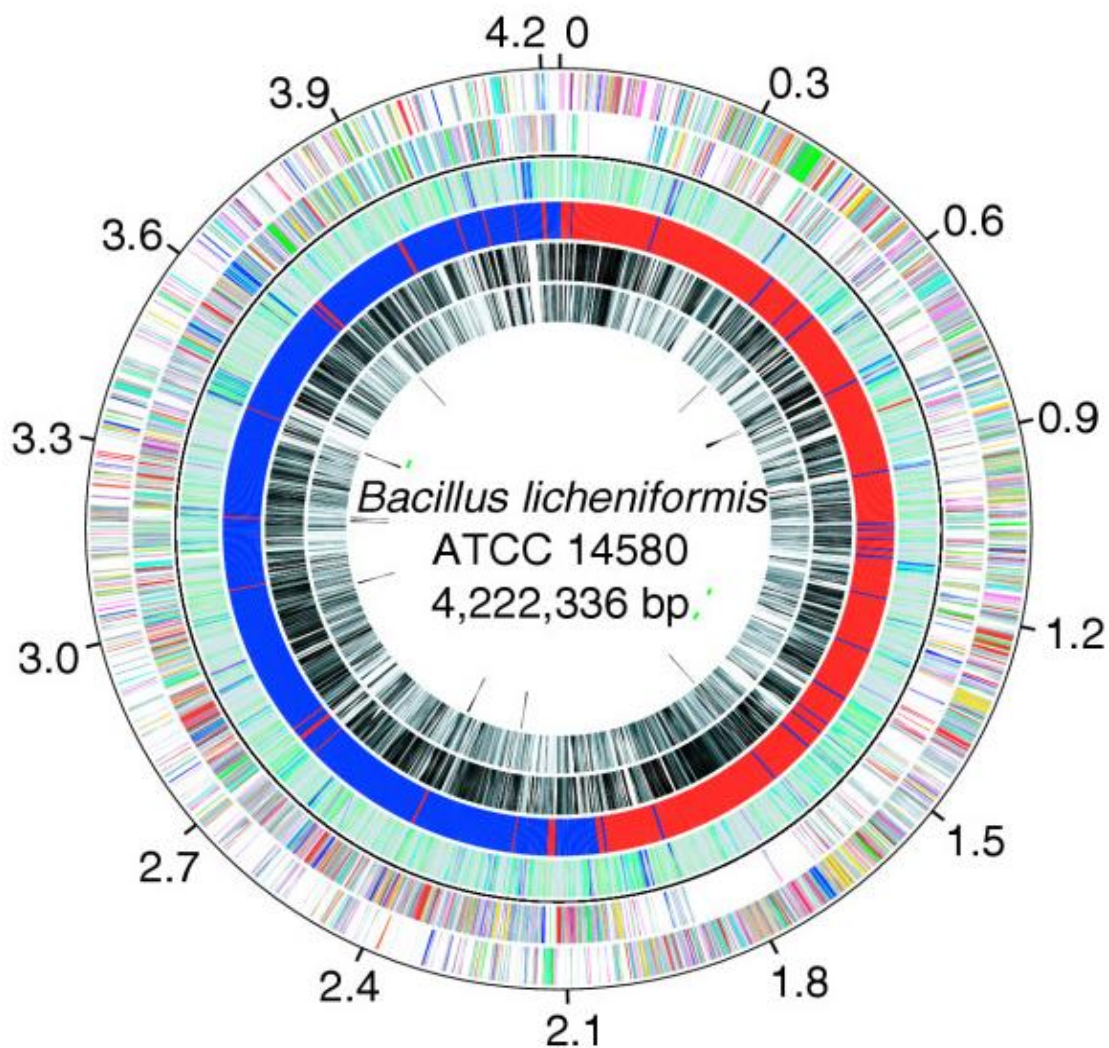


Рис. 3.2 Генетична карта хромосоми *B. licheniformis* [48]

На Рис. 3.2 представлено кругове зображення хромосоми *B. licheniformis* (штам ATCC 14580). Відлік кругів починається від зовнішнього (1) до внутрішнього (7). Круги 1 і 2 показують положення прогнозованих CDS на + та – полосах відповідно. Круг 3 показує % G + C; круг 4 – перекося GC ((G - C)/(G + C)); круг 5 – гомологію з *B. subtilis*; круг 6 – гомологію з *B. halodurans*; круг 7 показує положення дев'яти копій елемента послідовності вставки IS3Bli1 і передбачуваного гену транспозази; маленькі зелені полоси всередині круга 7 означають позиції можливих елементів профагу.

Ймовірне походження реплікації ідентифіковано за схожістю за деякими ознаками відповідних областей у *B. subtilis* та інших бактерій. Зокрема, сюди включається спільна локалізація чотирьох генів (*rpmH*, *dnaA*, *dnaN* і *recF*), переважання кількості GC ((G - C)/(G + C)) та присутність декількох *dnaA*-боксів і АТ-багатих послідовностей безпосередньо перед геном *dnaA*. На основі цієї інформації, було визначено цитозиновий залишок сайту рестрикції *BstBI*, що знаходиться між генами *rpmH* і *dnaA*, як перший нуклеотид геному *B. licheniformis*. Сайт термінації реплікації був локалізований біля 2602 мегабази (Мб) за допомогою аналізу, що визначає переважання кількості GC. Цей регіон знаходиться приблизно напроти джерела реплікації. На відміну від *B. subtilis*, у *B. licheniformis* немає очевидного гену, що кодує білок-термінатор реплікації (*rtp*) [48].

3.2 Загальні методи створення високопродуктивного промислового продуценту

Основна перевага мікроорганізмів як об'єктів селекції продуцентів – простіша, в порівнянні з еукаріотами, організація генетичного апарату. Одноклітинні організми, як правило, характеризуються більш високою швидкістю росту і синтетичних процесів, ніж вищі організми. Навіть, зважаючи на те, що ця особливість притаманна не всім мікроорганізмам, повільноростучі види представляють певний інтерес, оскільки багато з них здатні продукувати різноманітні цінні речовини.

Мікробіологічна промисловість в даний час використовує тисячі штамів мікроорганізмів, які первинно були виділені з природних джерел на підставі їх корисних властивостей, а потім поліпшені за допомогою різних методів. Методи сучасної селекції продуцентів ґрунтуються на генетичному конструюванні *in vivo* і *in vitro* [49,50].

Селекція – це спрямований відбір мутантів, тобто організмів, спадковість яких зазнала стрибкоподібної зміни внаслідок структурної модифікації в нуклеотидній послідовності ДНК [51].

					ДП 6222. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		47

Стратегія селекційної роботи з мікроорганізмами полягає в пошуку природних форм, які володіють будь-якими корисними для людини властивостями (здатність до синтезу цінних сполук, висока швидкість росту, здатність до засвоєння дешевих і доступних субстратів тощо), які поліпшують в подальшому, та створюють на їх основі промислові штами. Це завдання вирішується зазвичай шляхом зміни регуляції метаболічної активності клітини. Сучасні тенденції розвитку селекції продуцентів – конструювання промислових штамів із заданими властивостями з використанням новітніх досягнень фундаментальних галузей біології в поєднанні з прийомами класичної селекції [49].

Мікробіологічна промисловість пред'являє до продуцентів жорсткі вимоги, які важливі для технології виробництва: це висока швидкість росту, використання для життєдіяльності дешевих субстратів і стійкість до зараження сторонніми мікроорганізмами. Наукова основа цієї промисловості – вміння створювати мікроорганізми з новими, заздалегідь визначеними генетичними властивостями і вміння використовувати їх в промислових масштабах.

Підсумовуючи наведену інформацію, можна виділити ряд особливостей, які характерні для селекції мікроорганізмів:

- у селекціонера є необмежена кількість матеріалу для роботи: за лічені дні в чашках Петрі або в пробірках на поживних середовищах можна виростити мільярди клітин;
- більш ефективне використання мутаційного процесу, оскільки геном мікроорганізмів гаплоїдний, що дозволяє виявити будь-які мутації вже в першому поколінні;
- простота генетичної організації бактерій: вони мають значно меншу кількість генів, а їх генетична регуляція простіша, взаємодії генів прості або відсутні.

3.2.1 Використання природного та штучного добору для отримання промислових продуцентів

Природний відбір – це основний рушійний фактор еволюції. Він являє собою результат боротьби за існування та виражається в переважному виживанні й розмноженні найбільш пристосованих представників кожного виду організмів і загибелі менш пристосованих. Необхідною передумовою для дії природного відбору є спадкова мінливість організмів, а безпосереднім результатом природного добору є формування пристосування організмів до умов зовнішнього середовища. Наслідки природного відбору – збільшення різноманітності форм організмів, послідовне ускладнення організації в ході прогресивної еволюції, вимирання менш пристосованих видів [51].

Природний добір характеризується дуже повільними змінами за рахунок мутаційного процесу або випадкових флуктацій частот алелей внаслідок генетико-автоматичних процесів [52].

Відбір, що проводиться людиною, та полягає у відбракуванні колоній мікроорганізмів, які не представляють цінності і в розмноженні тих, які володіють цінними для людини ознаками, називається штучним. Несвідомим штучним відбором називається відбір, при якому селекціонер не ставить перед собою завдання змінити даний організм будь-яким чином, а лише враховує певні його особливості, що є необхідними для отримання продукту. Цільовим або свідомим називають відбір, який здійснюється відповідно до певної, заздалегідь поставленої мети, коли властивості організмів коригуються в певному напрямку [51].

Штучний добір проводиться в певних умовах, що створюються селекціонером. Відмінність між природним і штучним добором полягає в тому, у випадку штучного добору час, відведений на селекцію, обмежений, як і вибірка, з якою працює селекціонер. Тому штучний добір не можна проводити одразу за всіма ознаками: необхідно відбирати організми, що є кращими за певними ознаками, але середніми по всім іншим [52].

Методичний штучний добір має конкретне визначення кінцевої мети, за його використання очікується отримання певного результату, а відтак проводиться коригування та відбір в залежності від цього організмів в кожному поколінні, які варто залишити для подальшого розмноження. Для створення нових штамів з необхідними властивостями застосовуються штучний мутагенез – отримання спадкових змін організмів в результаті дії хімічних та фізичних факторів, що контролюються людиною [53].

3.2.2 Використання індукованого мутагенезу

Дуже важливим методом селекції мікроорганізмів є відбір мутантів, тобто організмів зі зміненими спадковими ознаками, що проявляються в результаті мутацій.

За своїм походженням мутації бувають спонтанними і індукованими. Спонтанні мутації виникають з низькою частотою (близько 10^{-5} - 10^{-6}). Ця можливість повинна враховуватися при виборі продуцентів. Для того, щоб відібрати такі мутанти, необхідно проаналізувати величезну кількість клонів (до мільярда) на предмет потрібних метаболічних відхилень. У селекції продуцентів найбільший інтерес представляють індуковані мутанти [52]. Індукований мутагенез веде до значного пришвидшення селекції, яке виникає за рахунок різкого підвищення частоти мутацій біооб'єкту при штучному пошкодженні геному.

За своєю природою мутагени підрозділяються на фізичні, хімічні та біологічні. Вибір мутагена визначається:

- 1) типом мутації, яку необхідно отримати;
- 2) ефективністю мутагена щодо даного мікроорганізму [49].

Серед фізичних агентів використовують УФ-опромінення і радіацію. УФ-опромінення викликає димерізацію піримідинів і є мутагеном широкого спектру дії. При використанні цього мутагену утворюються мутанти з транзиціями, трансверсіями і делеціями. Ефективність УФ-опромінення досить висока, проте висока частота мутацій досягається за рахунок низької

					ДП 6222. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		50

виживаності клітин. Крім того, такі мутанти добре відновлюються репараційними механізмами клітин. Рентгенівське випромінювання і техніка швидких нейтронів призводять до розривів хромосом, викликаючи делеції і інверсії. Мутагенний ефект цього методу досить високий, однак його застосування вимагає спеціального обладнання.

Більш широко застосовуються хімічні мутагени: аналоги основ, азотиста кислота, нітрозогуанідін, етилметансульфонат, акридинові барвники тощо. Аналоги основ викликають транзиції і трансверсії в результаті помилок реплікації, проте ефективність їх дії дуже низька. Гідроксиламін і азотиста кислота, що викликають дезамінування нуклеотидів, сприяють виникненню делецій і транзицій. Акридинові барвники викликають інтеркаляції між основами під час реплікації і сприяють виникненню мутацій зі зсувом рамки зчитування. Найбільш ефективними з хімічних агентів є нітрозогуанідін (НГ), який викликає алкілювання основ в реплікативній вилці і утворює мутанти з транзиціями, трансверсіями і делеціями. Етилметансульфонат, в порівнянні з НГ, викликає менше множинних мутацій і сприяє алкілювання гуаніну, в результаті чого з високою частотою утворюються транзиції і трансверсії [52].

Доза впливу фізичних мутагенів виражається в одиницях випромінювання, що відповідають типу променів. Доза хімічних мутагенів характеризується концентрацією мутагену і часом експозиції при відповідній температурі. При виборі дози мутагену орієнтуються на показник виживаності оброблюваної культури, який визначається відношенням числа колоній, які вирости після посіву мутагенізованої культури до числа колоній, які вирости після висіву тієї ж, але не обробленої мутагенами культури клітин. Виживання залежить від дози мутагену, від індивідуальної чутливості штаму до летального ефекту мутагену. У селекції використовуються дози, що забезпечують виживання клітин в діапазоні від 0,1 до 50-80% [49,52].

Індукований мутагенез та відбір продуктивних мутантів є важливим методом підвищення активності промислових штамів мікроорганізмів. При

					ДП 6222. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		51

цьому оброблену мутагеном культуру розсівають на щільні поживні середовища з таким розрахунком, щоб отримати окремі колонії, а потім дослідити кожний клон на продуктивність. Виділивши найпродуктивніший варіант, процедуру мутагенезу повторюють, тобто проводять ступінчатий відбір. Зазвичай ступінчатий відбір включає етапи мутагенезу, а також виділення спонтанних мутантів. Застосовуючи ступінчатий відбір, можна нічого не знати про шляхи біосинтезу цільового продукту і його регуляції, тобто селекція на підвищення активності штаму ведеться на основі уяви, що за допомогою мутацій можна підвищити продуктивність.

Проводять перевірку, скрінінг, отриманих клонів та відбирають найбільш продуктивні з них. Отримані клони повторно обробляють тим же або іншим мутагеном та знов вибирають найбільш продуктивний варіант. Процедуру повторюють багатократно, тобто здійснюють ступінчастий добір по ознаці, яка цікавить селекціонера.

Недоліком ступінчатого відбору є його колосальна трудомісткість та відсутність інформації про характер мутацій, відбір проводиться по кінцевому результату. Робота по створенню активного штаму цим методом часто займає роки роботи [54].

Для отримання промислових штамів *B. subtilis* та *B. licheniformis* застосовують спосіб опромінення УФ-світлом. Цей метод є одним з найпростіших та найзручніших. Для його проведення придатними є будь-які джерела УФ-світла з випромінюванням у короткохвильовій ділянці. У популяції бактеріальних клітин, які піддають дії УФ-променів, кожна з клітин має деяку вірогідність виживання за даної дози опромінення. Серед тих, що вижили, кожна бактерія має таку ж вірогідність виживання під дією повторної аналогічної дози. Таким чином, якщо доза подвоюється, то кількість бактерій, що вижили, буде зменшуватись пропорційно добутку вірогідностей ($0,1 \times 0,1$), тобто буде складати 1 % тих, що вижили. УФ є слабким мутагеном і найкращі результати отримують при виживаності від 0,1 до 1,0%. Для зменшення ефекту фотореактивації необхідно уникати

					ДП 6222. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		52

домішок видимого світла при обробці ультрафіолетом та забезпечити вирощування бактерій та інші операції, що проводяться з культурою, в умовах повної темряви [49, 55].

На ефективність мутагенезу впливають: густина суспензії, характер рідин, в якій суспендуються бактерії для опромінення та фізіологічні умови (стан) клітин.

При густині суспензії бактерій 5×10^8 кл/см³ і більше деякі клітини екрануються іншими, що призводить до неоднакового відсотку загибелі клітин. Це відбувається через те, що УФ погано проникає у товщу суспензії.

Бульйон сильніше поглинає УФ-радіацію, ніж буферні розчини, тому ефективність дози для бактерій, що суспендовані в бульйоні, знижується. Крім того, в бульйоні, що піддається опроміненню, також можуть утворюватися отруйні органічні перекиси, які продовжують летальну дію опромінення після фактичного часу дії опромінення.

Форма кривої виживаності залежить від кількості летальних ударів та від кількості УФ-чутливих мішеней всередині клітини. При вищих дозах опромінення більшість клітин буде отримувати необхідну кількість летальних ударів, і крива виживаності стане експоненціальною. Найбільша мутагенна активність проявляється при УФ-опроміненні з довжиною хвилі 260 нм, при якій спостерігається максимум поглинання УФ-світла ДНК. Про ефективність проведеного мутагенезу можна судити по відносній кількості клітин, які вижили при опроміненні летальними дозами УФ-світла [55].

3.2.3 Використання гібридизації для створення промислових продуцентів біологічно-активних речовин

У бактеріальних клітинах перенос генетичного матеріалу можливий за допомогою механізмів кон'югації, трансдукції та трансформації, що веде до гібридизації бактерій.

Кон'югація – це безпосередній контакт між клітинами бактерій внаслідок якого відбувається перенесення генетичного матеріалу з клітин донора в клітини реципієнту.

Трансформація бактерій – це перенесення успадкованих ознак з одних клітин в інші за допомогою ДНК. При трансформації ДНК, яка виділена з клітин одного штаму, поглинається клітинами іншого штаму, які є реципієнтними. За допомогою генетичних маркерів це можна відслідковувати по зміні фенотипу реципієнта.

Трансдукцією називають перенесення генів з одних бактеріальних клітин в інші за допомогою бактеріофагу [52].

Ці три способи обміну генетичною інформацією між бактеріями є основними. Дані методи, а також методи генної та клітинної інженерії, регуляції метаболізму у мікробній клітині не використовуються при створенні промислових пробіотичних штамів *B. subtilis* та *B. licheniformis*.

3.3 Схема отримання пробіотичних організмів, що використовуються в роботі

3.3.1 Опис схеми отримання продуцентів

За допомогою ненаправленого багатоступінчастого УФ-мутагенезу та селекції з *B. subtilis* та *B. licheniformis* були отримані нові штами, що володіють всіма властивостями, характерними для вихідного штаму та відрізняється від нього збільшеною антагоністичною активністю щодо *Candida albicans* [56].

Отримання промислового продуценту починають з етапу виділення *B. subtilis* та *B. licheniformis* з шлунково-кишкового тракту здорових людей. Проводять підготовку виділених культур до селекційної роботи, вивчаючи їх пробіотичні характеристики, а також досліджуючи морфологію, яка повинна відповідати такій, що описана в підрозділі 1.3 “Морфолого-цитологічні ознаки”.

					ДП 6222. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		54

Мікроорганізми, що використовуються для створення промислових штамів пробіотичних культур, мають відповідати таким критеріям:

- виробничі штами повинні бути виділені з природних субстратів;
- бути ідентифіковані до виду по фено- і генотиповим ознакам;
- мають мати генетичний паспорт;
- штами повинні володіти широким спектром антагоністичної активності по відношенню до патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів;
- не повинні пригнічувати нормальний мікробіоценоз;
- мають надавати позитивний ефект на організм господаря, наприклад, збільшувати протиінфекційну резистентність;
- мають володіти здатністю до виживання і життєдіяльності в умовах організму людини, наприклад, мікроорганізм повинен бути резистентний до низьких значень рН і органічних кислот, до високого вмісту жовчі, солей натрію;
- повинні швидко розмножуватися;
- повинні бути непатогенними і нетоксичними, безпечними для людей, включаючи імунологічну безпеку;
- виробничі штами повинні бути стабільними по біологічній активності, життєздатними протягом тривалого терміну зберігання і задовольняти технологічним вимогам [57].

Наступним етапом є очистка культури та відбір клітин з бажаними властивостями. Клітини, що досліджуються, мають володіти антагоністичною активністю по відношенню до *Candida albicans*.

Вихідний штам розсівають на чашки Петрі і відбирають кілька сотень клонів, що мають типову для даної культури морфологію, і варіанти з деякими морфологічними відхиленнями.

Проводять кілька пасажів для підтвердження того, що ці варіанти зберігають свої морфологічні особливості. Оцінюють рівень антагоністичної активності у варіантів, з типовою для даної культури морфологією, і з деякими морфологічними відхиленнями. Така оцінка дає можливість виявити

					ДП 6222. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		55

кореляцію між особливостями морфології клонів і рівнем антагоністичної активності.

Кілька клонів з найбільш високою антагоністичною активністю по відношенню до контролю (культура, яку спочатку не розсівали) відбирають і перевіряють на антагоністичну активність в декількох повторах, а потім відбирають один клон, що має постійний високий рівень антагоністичної активності по відношенню до *Candida albicans*. Така тривала процедура називається «чисткою вихідної культури» і призводить до відбору клону з помітно підвищеною антагоністичною активністю. Наступні операції називаються «стабілізацією культури».

Відібраний клон знову розсівають і оцінюють його рівень антагоністичної активності, шляхом аналізу не менше 100 типових клонів. Значення рівнів антагоністичної активності таких субклонів виражають у відсотках по відношенню до активності вихідного (батьківського) і розміщують у варіаційному ряду 1, обчислюючи для них статистичні показники: середнє арифметичне (\bar{X}); відхилення (σ); коефіцієнт мінливості ($CV = \sigma \times 100$).

Субклони, що потрапили в крайню праву частину цього ряду (максимальна продукція), відбирають і знову оцінюють за рівнем продукції [58].

При цьому відбирається тільки один з них. Цей субклон знову розсівають і, перевіривши не менше 100 висіяних клонів, будують варіаційний ряд 2, обчислюючи його показники. Порівнюють показники коефіцієнта мінливості двох варіаційних рядів. Якщо ці значення істотно не відрізняються, то підготовку вихідного для селекції штаму закінчують, відбираючи субклони з 1-го варіаційного ряду, а 2-й ряд (власний ряд цього субклону) вважають контрольним. Якщо, при порівнянні коефіцієнтів мінливості у 2-го ряду, спостерігається його зменшення, то доцільно провести ще один етап клонування, вибравши з правої частини 2-го ряду «кращий клон». Будують на його основі 3-й варіаційний ряд і визначають

					ДП 6222. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		56

його коефіцієнт. Якщо значення коефіцієнтів мінливості 2-го і 3-го рядів не відрізняються, то клонування припиняють, а якщо знову спостерігаються відмінності, то продовжують процедуру [49,58].

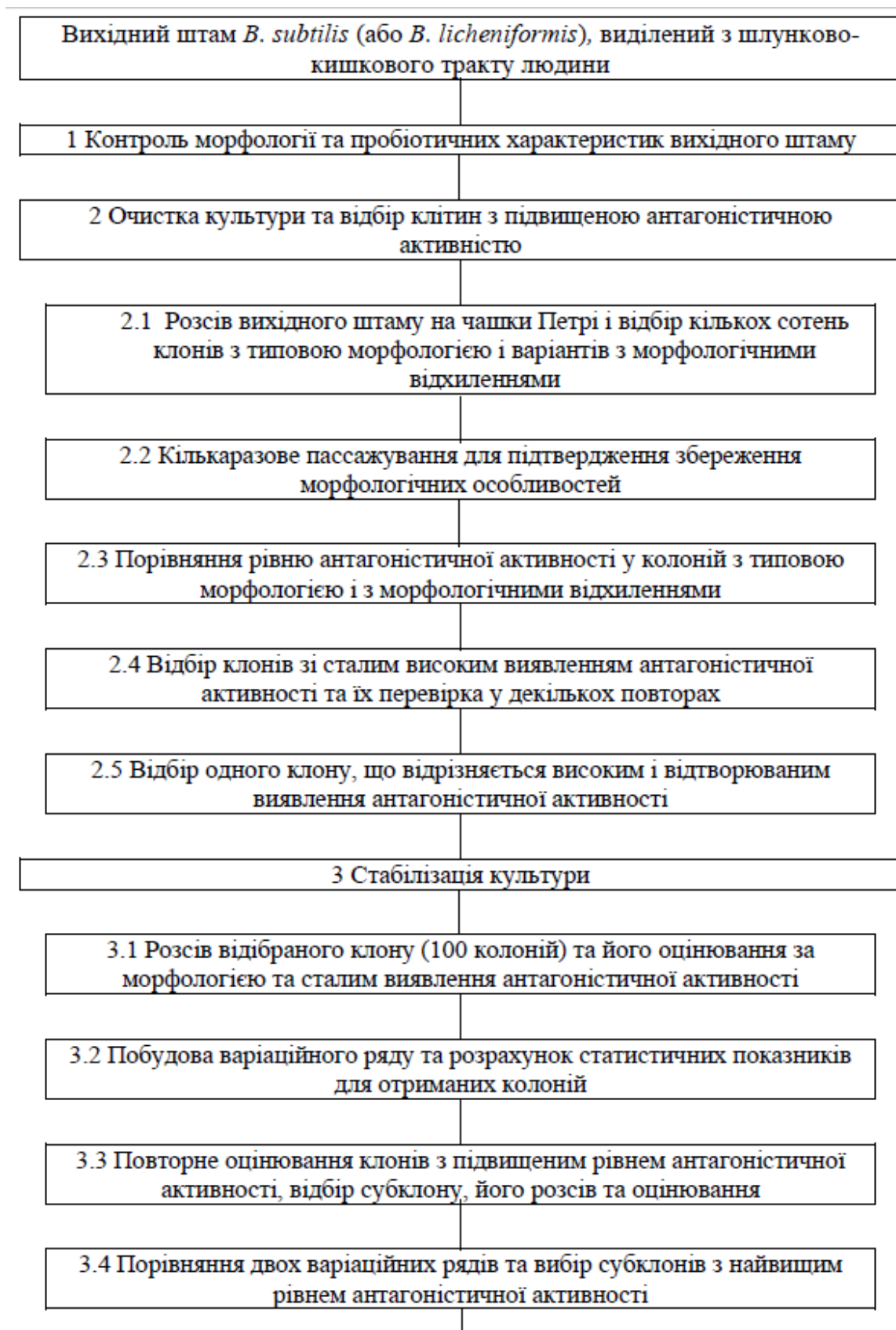
Далі проводять УФ-мутагенез. Для цього водну суспензію спор поміщають на відстань 40 см від УФ лампи потужністю 12,5 Вт з довжиною хвилі 254 нм, при цьому інтенсивність випромінювання лампи становить 0,25 мВт/см². Змив з поверхні агаризованого середовища фільтрують через фільтрувальну воронку Шотта (розмір пір 100 мкм). В отриманій суспензії за допомогою камери Горяєва-Тома підраховують концентрацію спор. При необхідності суспензію розводять до концентрації $(1,5-2) \times 10^6$ спор/см³. Після підрахунку та розведення суспензія піддається опроміненню у відкритій чашці Петрі. Посів опроміненої суспензії проводять на попередньо підготовлені чашки Петрі з агаром, що містить в складі мікрокристалічну целюлозу (МКЦ).

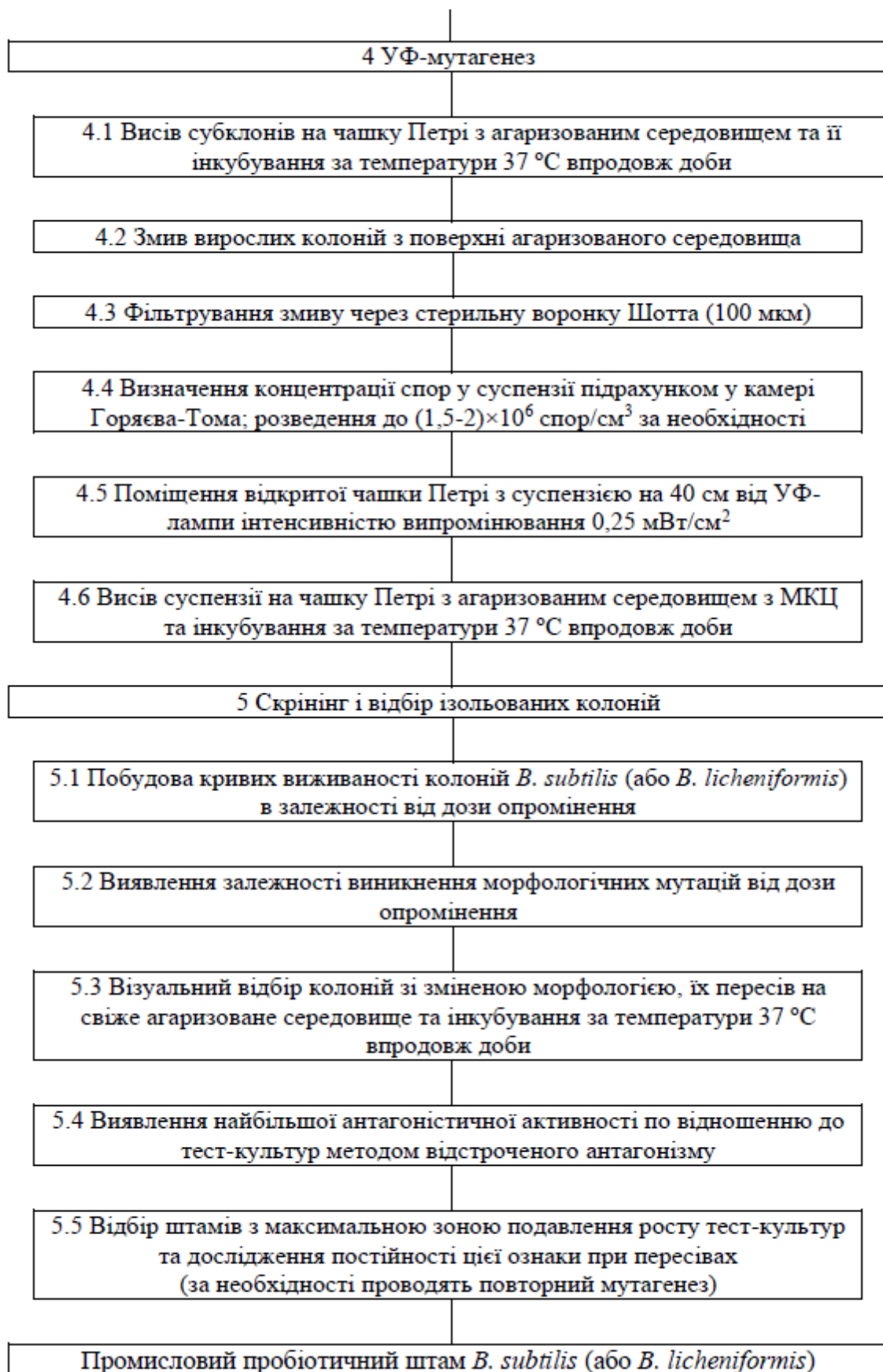
Проводять скринінг і відбір ізольованих колоній. На першому етапі будують криві виживання колоній *B. subtilis* (або *B. licheniformis*) в залежності від дози опромінення, а також визначають залежність частоти виникнення морфологічних мутацій від дози опромінення. З урахуванням цих даних визначають оптимальну дозу опромінення, що дає максимальне число мутацій і в той же час забезпечує певну ступінь виживання колоній. Ступінь виживання колоній визначали по співвідношенню колоній, що вирости в неопроміненому контролі і після УФ-опромінення. Колонії зі зміненою морфологією візуально відбирають і пересівають на свіже щільне середовище.

Після інкубування чашки Петрі з виростими ізольованими колоніями використовують для виявлення найбільшої антагоністичної активності по відношенню до тест-культури методом відстроченого антагонізму. Відбір штамів здійснюють за наявністю максимальної зони пригнічення росту тест-культури. В результаті було отримують штами, які дають максимальну величину зони пригнічення росту *Candida albicans* на рівні 25 мм [56].

					ДП 6222. 00.000 ПЗ	Арк.
						57
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

3.3.2 Схема отримання продуцентів





РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

4.1 Характеристика кінцевої продукції виробництва

Назва продукції: Біоспорин.

Нормативно-технічні документи: ТУ У 10.8-36273281-002:2013, стаття “Дієтичні добавки” у ДФУ 2.4.

Призначення продукції та можливі галузі використання:

- для нормалізації мікробіоценозу кишечника у разі його порушення;
- у випадках, пов'язаних з виникненням діареї, запорів, здуття живота, що виникли зокрема на тлі антибіотикотерапії;
- для зниження алергенності продуктів, що містять глютен або білки коров'ячого молока;
- для стимуляції росту лакто-і біфідобактерій;
- під час подорожей [37].

Біоспорин використовується як дієтична добавка (ДД). Не є лікарським засобом, проте можливе його застосування у медичній галузі, зокрема:

- дітьми раннього віку при гострих кишкових інфекціях легких та середніх форм, а також важких форм (у пацієнтів з протипоказаннями до антибіотикотерапії), які спричинені патогенними та умовно-патогенними мікроорганізмами; при дисбактеріозах та дисфункції кишечника; профілактиці гнійносептичних ускладнень у після операційний період; хронічному афтозному стоматиті та у період реконвалесценції після гострих кишкових інфекцій.

- дорослими, у тому числі вагітними, та дітьми старшого віку при кишкових інфекціях, хронічному коліті, синдромі подразненого кишечника,

					ДП 6222. 00.000 ПЗ		
Зм.	Арж.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА		
Розробив	Юрченко Е.В.						
Консульт.							
Керівник	Ялашенко О. І.						
Затвер.							
					Стадія	Аркуш	Аркушів
					Д	60	144
					КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		

кандидозі, atopічному дерматиті [59].

Зовнішній вигляд: порошок або пориста маса від світло-сірого до бежевого або темно-сірого кольору (можливо з світло- або темно-коричневим відтінком). Кінцева вологість препарату становить 3-4%, має специфічний запах та солодкуватий смак.

Склад препарату. В 1 флаконі міститься 1 доза препарату, до якої входять спори і живі мікробні клітини *B. subtilis* УКМ В-5007 та *B. licheniformis* УКМ В-5514 в кількості не менше $1,1 \times 10^9$ КУО. Допоміжні речовини у складі препарату: сахароза, желатин, сухе знежирене молоко [37]. У складі пробіотичного препарату наявні два природні штами бацил, при цьому частина живих бацил (не менш як 50 %) перебуває у споровій формі, а співвідношення штамів *B. subtilis* та *B. licheniformis* становить 3:1 [38].

Нормативні вимоги до упаковки, маркування, транспортування, зберігання та терміну придатності продукції:

Упаковка. Пачка препарату Біоспорин має відповідати вимогам ОСТ 64-071-89. Вона виготовляється з картону коробкового за ГОСТ 7933-89 з перегородками з гофрованою вкладкою за ТУ У 64-23518596-001-99. Флакони скляні, типу ФІ-1-5 зі скла марки НС-3, виготовляються за ТУ 9461-010-00480514-99. Пробки мають відповідати ТУ У 25.1-00152253.037-2004, а алюмінієві ковпачки типу К-2-20 або К-2-14 – ТУ У 25206109.001-2001 [38].

Маркування. На флакон фарбою глибокого друку для скляних виробів за ТУ У 42.34.011-97 українською або російською мовою наноситься: назва препарату, кількість доз, номер серії, термін придатності.

На етикетці флакону, виготовленій з етикеткового паперу за ГОСТ 7625-86, українською та російською мовами наводять інформацію про:

- назву препарату латинською, українською та російською мовами;
- назву та повну адресу й телефон виробника, адресу потужностей (об'єкта) виробництва, товарний знак;
- назву категорій окремих інгредієнтів, що характеризують ДД;

					ДП 6222. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		61

- склад інгредієнтів ДД;
- кількість доз;
- порцію ДД, рекомендовану для щоденного споживання;
- попередження не перевищувати зазначену рекомендовану кількість (порцію) для щоденного споживання;
- вказівку на те, що ДД не слід використовувати як заміну повноцінного раціону харчування;
- кінцеву дату споживання «Вжити до» або дату виробництва та термін придатності;
- номер партії виробництва;
- умови зберігання та використання;
- застереження про те, що продукт потрібно зберігати в недоступному для дітей місці;
- застереження щодо споживання ДД певними категоріями населення (дітьми, вагітними жінками, літніми людьми, спортсменами та алергіками), якщо такий продукт може негативно впливати на їх здоров'я у разі його споживання;
- наявність або відсутність у складі ДД генетично модифікованих організмів;
- якщо в складі ДД є алерген, його назва має бути виділена в списку інгредієнтів в якийсь спосіб, наприклад, жирним шрифтом або шрифтом іншого кольору [60].

На пачці та етикетці групової тари українською та російською мовами наносять: «Україна», виробник, товарний знак та адресу, назву препарату латинською, українською та російською мовами, лікарську форму, кількість доз, кількість флаконів, «Для застосування перорально», умови зберігання, «Зберігати у недоступному для дітей місці», номер серії, відповідна нормативна документація, термін придатності, штрих-код, реєстраційний номер у країні імпортерів (за необхідності).

					ДП 6222. 00.000 ПЗ	Арк.
						62
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Номер серії та термін придатності допускається наносити збоку пачки методом тиснення. Пачки з продуктом по 50 штук вкладають в ящики. На етикетці групової тари додатково вказують кількість упаковок. Ящики з пачками оклеюють скотчем по швам. Транспортне маркування відповідно до ГОСТ 14192-96.

Транспортування. Пробіотичний препарат Біоспорин транспортують у закритих транспортних засобах усіма видами критого транспорту за температури не вище 25 °С відповідно до ГОСТ 17768-90 та СТ-Н МОЗУ 42-5.1:2011 “Лікарські засоби. Належна практика зберігання”.

Зберігання та термін придатності. Зберігати препарат Біоспорин необхідно в оригінальній упаковці виробника у сухому, захищеному від світла місці за температури не вище 25°C. Зберігати в недоступному для дітей місці. Термін придатності препарату складає 2 роки [38, 60].

					ДП 6222. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		63

4.2 Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів, що
використовується у виробництві

Таблиця 4.1 Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів

Найменування	Категорія і номер НТД, згідно якої перевіряються показники якості	Показники, що обов'язкові для перевірки та їх нормативне призначення	Примітка
1	2	3	4
1. Основна сировина			
1.1 Борошно кукурудзяне	ГОСТ 14176-69	Вологість – не більш за 15%; зольність та жир в перерахунку на суху речовину – не більш за 0,9% та 2,5% відповідно; металомангнітні домішки масою до 0,4 мг – не більш за 3 мг в 1 кг муки та інші показники згідно з ГОСТ	Компонент поживного середовища
1.2 Вода очищена	СТ-Н МОЗУ 42-3.7:2013	Нітрати – не більше 0,00002%; важкі метали – не більше 0,00001%; загальний органічний вуглець – не більше 0,5 мг/л та інші показники аналогічні до води питної згідно з ДСанПіН.	Компонент поживного та захисного середовища
1.3 Желатин	ГОСТ 11293-89	Масова доля вологи – не більш за 16%; тривалість розчинення – не більш за 25 хв та інші показники згідно з ГОСТ	Компонент захисного середовища
1.4 Крейда	ГОСТ 12085-88	Масова доля вуглекислого кальцію та вуглекислого магнію в перерахунку та вуглекислий кальцій – не менш за 98,5% та інші показники згідно з ГОСТ	Компонент поживного середовища
1.5 Крохмаль	ДСТУ 4286:2004	Масова частка вологи – 17-20%; масова частка загальної золи – не більше, ніж 0,30% та інші показники згідно з ДСТУ	Компонент поживного середовища

Продовження таблиці 4.1

1	2	3	4
1.6 Кислота олеїнова	ГОСТ 7580-91	Масова доля жирних кислот у безводному продукті – не менш за 97,4% та інші показники згідно з ГОСТ	Піногасник
1.7 Сульфат амонію	ГОСТ 9097-82	Масова доля азоту в перерахунку на суху речовину – не менш за 21%; масова доля води – не більш за 0,2%; масова доля сірчаної кислоти – не більш за 0,03% та інші показники згідно з ГОСТ	Компонент поживного середовища
1.8 Сахароза	ГОСТ 5833-75	Масова частка нерозчинних у воді речовин – не більш за 0,001% та інші показники згідно з ГОСТ.	Компонент захисного середовища
1.9 Молоко сухе знежирене	ГОСТ 10970-87	Масова доля вологи – не більш за 4,0%; масова доля жиру – не більш за 1,5%; масова доля білку – не менш за 32,0% масова доля лактози – не менш за 50,0% та інші показники згідно з ГОСТ	Компонент захисного середовища
1.10 Музейна культура штаму <i>Bacillus licheniformis</i> УКМ В-5514		Характерна для продуценту морфологія, стороння мікрофлора відсутня	Для отримання посівного матеріалу
1.11 Музейна культура штаму <i>Bacillus subtilis</i> УКМ В-5007		Характерна для продуценту морфологія, стороння мікрофлора відсутня	Для отримання посівного матеріалу
2. Допоміжна сировина			
2.1 Біомой	ТУ У 22902465.005-96	Усі вимоги згідно ТУ У	Для миття приміщень, обладнання, комунікацій, первинної тари

Продовження таблиці 4.1

1	2	3	4
2.2 Вода очищена	СТ-Н МОЗУ 42-3.7:2013	Див. 1.2	Для кінцевого обполіскування первинної тари середини обладнання
2.3 Вода питна	ДСанПіН 2.2.4-171-10	Загальна жорсткість – не більше 7,0 ммоль/дм ³ ; водневий показник – 6,5-8,5 та інші показники згідно з ДСанПіН.	Для миття та обполіскування приміщень, обладнання та комунікацій; початкового обполіскування первинної тари. Холодо- та теплоносій.
2.4 Водню перекис	ГОСТ 177-88	Масова доля перекису водню – 30-40% та інші показники згідно з ГОСТ.	Для дезінфекції приміщень, обладнання та комунікацій
2.5 Дегмін	ФС 42-1775-89	Усі вимоги згідно ФС.	Для дезінфекції приміщень, обладнання та комунікацій
2.6 Етилену оксид	ГОСТ 7568-88	Масова доля оксиду етилену – не менш 99,9% та інші показники згідно з ГОСТ	Стерилізація фільтру фінішної очистки та його комунікацій
2.7 Кислота мурашина	ГОСТ 1706-78	Масова доля мурашиної кислоти – не менше за 98,5% та інші показники згідно з ГОСТ	Для дезінфекції приміщень, обладнання та комунікацій
2.8 Кислота соляна	ГОСТ 3118-77	Масова доля соляної кислоти – не менш 38% та інші показники згідно з ГОСТ	Для корекції кислотності культуральної рідини
2.9 Натрій двовуглекислий	ГОСТ 2156-76	Масова доля натрію двовуглекислого – не менш 99,5%, масова доля вуглекислого натрію – не більш за 0,4% та інші показники згідно з ГОСТ	Для підготовки гумових пробок

Продовження таблиці 4.1

1	2	3	4
2.10 Натрій гідроксид	ГОСТ 4328-77	Масова доля натрію гідроксиду – не менш 99% та інші показники згідно з ГОСТ	Для корекції кислотності культуральної рідини
2.11 Натрій хлористий	ГОСТ 4233-77	Масова доля хлористого натрію – не менш за 99,9% та інші показники згідно з ГОСТ	Для регенерації іонообмінної смоли
2.10 Спирт етиловий ректифікований	ДСТУ 4221:2003	Об'ємна частка етилового спирту за температури 20 °С – не менше за 96,0% та інші показники згідно з ГОСТ	Для дезінфекції приміщень, обладнання та комунікацій
2.11 Формалін	ГОСТ 1625-89	Масова доля формальдегіду – $37,2 \pm 0,3\%$; масова доля метанолу – 4-8% та інші показники згідно з ГОСТ	Стерилізація фільтру фінішної очистки та його комунікацій
2.12 Хлоргексидину біглюконат 20%	ФС 42-2761-90	Усі вимоги згідно ФС	Для дезінфекції приміщень, обладнання та комунікацій
3. Матеріали			
3.1 Вугілля активоване	ГОСТ 6217-74	Зерна чорного кольору без механічних домішок та інші вимоги згідно з ГОСТ	Для фільтрування води
3.2 Ковпачки алюмінієві	ТУ У 28.7-30883300-005-2002	Усі вимоги згідно ТУ У	Для первинного пакування готової продукції
3.3 Папір етикетковий	ГОСТ 7625-86	Усі вимоги згідно ГОСТ	Для етикетування первинної тари
3.4 Пачка картонна	ОСТ 64-071-89	Усі вимоги згідно ОСТ	Для вторинного пакування готової продукції

Продовження таблиці 4.1

1	2	3	4
3.5 Пробки гумові	ТУ У 25.1-00152253.037-2004	Усі вимоги згідно ТУ У	Для первинного пакування готової продукції
3.6 Фільтри високоефективної очистки	ДСТУ EN 1822-1-2001	Ефективність фільтрації не менш за 99,999995% та інші показники згідно з ДСТУ	Для підготовки повітря
3.7 Фільтри грубої та тонкої очистки	ГОСТ 30528-97	Ефективність фільтрації не менш за 80-90% і 95-98% та інші показники згідно з ГОСТ	Для підготовки повітря
3.8 Флакони скляні	ТУ 9461-010-00480514-99	Усі вимоги згідно ТУ У	Для первинного пакування готової продукції
4. Напівпродукти			
4.1 Флакони з рідким напівпродуктом	Згідно виробничого регламенту	Відсутність сторонньої мікрофлори та інші показники згідно виробничого регламенту	Для висушування
4.2 Флакони висушеним напівпродуктом	Згідно виробничого регламенту	Відсутність сторонньої мікрофлори та інші показники згідно виробничого регламенту	Для герметизації та пакування

4.3 Опис технологічного процесу

*ДР 1 Санітарна підготовка виробництва**ДР 1.1 Підготовка персоналу*

На виробництві має бути відповідна кількість співробітників з необхідною кваліфікацією та практичним досвідом роботи. Весь персонал повинен знати принципи належної виробничої практики (GMP), що стосуються його діяльності, а також пройти первинне і подальше навчання відповідно до його обов'язків, включаючи інструктаж з виконання гігієнічних вимог. Виробник повинен забезпечити навчання всього персоналу, обов'язки якого передбачають перебування у виробничих зонах та зонах зберігання або

в контрольних лабораторіях, та іншого персоналу, діяльність якого може вплинути на якість продукції.

Крім основного навчання щодо теорії і практики системи управління якістю та GMP, кожен прийнятий на роботу співробітник повинен пройти навчання відповідно до закріплених за ним обов'язків.

Під час навчальних занять слід докладно обговорити фармацевтичну систему якості, а також всі заходи, що можуть поліпшити її розуміння і впровадження.

При влаштуванні на роботу кожен повинен пройти медичний огляд. Після першого медичного огляду подальші проводяться періодично, а також у тих випадках, коли це необхідно для роботи або здоров'я персоналу.

Мають бути вжиті заходи, які б гарантували, щоб жоден співробітник з інфекційним захворюванням або відкритими ранами на відкритих ділянках тіла не був зайнятий у виробництві. Кожна особа, яка входить у виробничі зони, повинна носити захисний одяг, що відповідає виконуваним нею операціям. Персонал повинен бути навчений правилам застосування засобів для миття рук.

Необхідно, щоб одяг і його якість відповідали процесу і класу робочої зони. У виробництві препарату Біоспорин використовуються приміщення класів чистоти В (А), С та D. Опис необхідного одягу для кожного класу:

Клас D: волосся і борода (при наявності) мають бути закриті. Слід носити звичайний захисний костюм і відповідне взуття або бахіли. Мають бути вжиті відповідні заходи для запобігання будь-якій контамінації чистої зони ззовні.

Клас C: волосся, а також борода і вуса (при їх наявності) мають бути закриті. Необхідно носити комбінезон або брючний костюм, що щільно прилягає на зап'ястях і має високий комір, а також відповідне взуття або бахіли. Від них практично не мають відокремлюватися волокна або часточки.

Клас В(А): головний убір має повністю закривати волоссяний покрив голови; він має бути вставлений у комір костюма; необхідно на обличчі

					ДП 6222. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		69

носити маску для запобігання поширенню крапельок. Слід носити відповідним чином простерилізовані та ненапудрені гумові або пластикові рукавички і простерилізовані або продезінфіковані бахіли. Нижні краї штанів мають бути вставлені в бахіли, а рукави одягу – у рукавички. Захисний одяг практично не має виділяти волокна або часточки і має затримувати часточки, що відокремлюються від тіла.

Кожен робітник у приміщенні класу В повинен бути забезпечений чистим стерильним (простерилізованим або таким, що пройшов відповідну санітарну обробку) захисним одягом для кожної зміни або принаймні на один день. Рукавички під час роботи потрібно регулярно дезінфікувати. Маски і рукавички необхідно змінювати принаймні кожну зміну.

Контроль мікробної контамінації рук, періодичність – не рідше 2 разів у тиждень та 1 раз на 2 тижня – після обробки рук дезінфекційними розчинами.

ДР 1.2 Приготування мийних, дезінфікуючих та мийно-дезінфікуючих розчинів

Миючі і дезінфікуючі засоби необхідно контролювати щодо мікробіологічної чистоти. Їх розчини слід тримати в попередньо очищених контейнерах й зберігати лише протягом установлених термінів.

ДР 1.2.1 Приготування розчину дегміну

Для приготування робочого розчину дегміну в скляному бутілі місткістю 10 л необхідно розчинити 100 г дегміну в 1 л води питної. Після розчинення додати 9 л води питної, ретельно перемішати і профільтрувати у стерильну ємність через мембранний фільтр з порами розміром 0,45 мкм. Розчин дегміну масовою долею 1% можна зберігати в герметично закритій скляній ємності впродовж 1 місяця.

ДР 1.2.2 Приготування розчину рецептури “С-4”

Рецептура “С-4” – це суміш розчинів пероксиду водню та мурашиної кислоти, з яких в процесі приготування утворюється надмурашина кислота, що володіє високою бактерицидною та спорицидною активністю.

					ДП 6222. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		70

Необхідну кількість інгредієнтів змішують у скляній ємності, яку поміщають на 1,0-1,5 годин в холодну воду, та періодично струшують. Приготований розчин фільтрують у стерильну ємність через мембранний фільтр з порами розміром 0,45 мкм. Приготований розчин можна зберігати в герметично закритій скляній ємності в прохолодному місці не довше доби.

ДР 1.2.3 Приготування розчину хлоргексидину біглюконату

Для приготування розчину хлоргексидину біглюконату хлоргексидин біглюконат, масовою долею 20%, необхідно розвести в розчині етилового спирту, об'ємною долею 70%, у співвідношенні 1:40 і профільтрувати в стерильну ємність через мембранний фільтр з порами розміром 0,45 мкм. Приготований розчин хлоргексидину біглюконату можна зберігати в герметично закритій скляній ємності впродовж 1 місяцю.

ДР 1.2.4 Приготування розчину пероксиду водню

Розчин готують у скляному посуді шляхом додавання пероксиду водню у воду питну. Для приготування 6%-го розчину до 820 мл води питної додають 180 мл пероксиду водню. Готовий розчин можна зберігати впродовж 5 діб.

ДР 1.2.5 Приготування мийних та мийно-дезінфікуючих розчинів

Для ручного та циркуляційного миття технологічного обладнання і комунікацій, скляної і полімерної тари та інвентарю використовують 0,5 % розчин біомою температурою 40 ± 5 °C.

Для приготування 1 л 0,5%-го розчину біомою у емальовану ємність з 995,0 см³ питної води додають 0,5 г біомою. Приготований робочий розчин має бути використаний впродовж доби.

Для приготування мийно-дезінфікуючих розчинів необхідно в питну воду спочатку додати миючий засіб у кількості 5 г/л і довести до 1 л обраним з вищенаведених готовим дезінфікуючим розчином.

Миючі і дезінфікуючі засоби необхідно контролювати щодо мікробіологічної чистоти. Їх розчини слід тримати в попередньо очищених контейнерах й зберігати лише протягом установлених термінів.

					ДП 6222. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		71

ДР 1.2.6 Приготування розчину хлориду натрію

Для приготування 10% розчину хлориду натрію на 1 літр нагрітої до 40°C води питної береться 100 г хлориду натрію. Розчин використовують гарячим.

ДР 1.3 Підготовка виробничих приміщень

Підготовка виробничих приміщень – одне з найважливіших заходів щодо забезпечення чистоти і зведення до мінімуму механічних і мікробних забруднень.

Під санітарною підготовкою виробничих приміщень до роботи мається на увазі комплекс заходів, який складається з вологого прибирання, дезінфекції і УФ-опромінення стін, підлог та іншої поверхні, і досягнення відповідного класу чистоти. Підготовка виробничих приміщень поділяється на щоденну і генеральну. Прибирання виробничих приміщень слід проводити щозміни, а генеральне прибирання – один раз у 5–6 днів або негайно, на вимогу бактеріолога.

Під час прибирання застосовується 6%-вий розчин водню пероксиду, 1 %-вий розчин дегміну, 0,5 %-вий розчин хлорогексидину біглюконату та розчин рецептури «С-4», оскільки тривале використання одного дезінфекційного засобу призводить до утворення стійких штамів мікроорганізмів. Зміна дезінфекційного засобу відбувається кожні 10–14 днів.

Щоденну санітарну обробку чистих виробничих приміщень виконують розчином перекису водню 6% або іншими дезінфектантами, що були підготовані на стадії ДР 1.2, з миючим засобом. Щоденна обробка проводиться після кожної зміни вологим засобом. Стіни, двері та інші поверхні приміщення протирають поролоновою губкою, змоченою робочим розчином з розрахунку 100-150 мл на 1 м² стелі. Цим же розчином миють підлогу.

При генеральній обробці виробничих чистих приміщень так само використовуються дезінфектанти з миючим засобом. Генеральну обробку

					ДП 6222. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		72

проводять вологим засобом один раз у 5-6 днів. Стіни, двері, стелі, та інші поверхні зрошують з гідропульту робочим розчином з розрахунку 150–200 мл/л. Після закінчення зрошення приміщення закривають на 30–40 хвилин, після цього вилучають надлишок розчину за допомогою губки. Особливо забруднені місця додатково миють цим же розчином. Стіни, двері та інші поверхні приміщення протирають поролоновою губкою, змоченою робочим розчином, після цього цим же розчином миють підлогу.

Дезінфекція приміщень і поверхонь обладнання призводить, як правило, до зниження мікроорганізмів на 40–60 % від їх початкового вмісту.

ДР 1.4 Підготовка виробничого обладнання

ДР 1.4.1 Миття і дезінфекція обладнання та підготовка матеріалів

Під підготовкою технологічного обладнання мається на увазі миття і стерилізація з'ємних частин (вузлів) або обробка внутрішніх і зовнішніх частин дезінфікуючими засобами. З'ємні частини (вузли) обладнання, що безпосередньо контактують з поживним середовищем, посівною масою та культуральною рідиною необхідно зняти, розібрати і ретельно вимити в розчині миючого засобу 0,5% від ДР 1.2.5 при температурі 60 °С, після цього декілька разів обполоснути водою очищеною. Розбирання та знімання вузлів виконується спеціальним персоналом.

Внутрішні частини обладнання обробляють розчином миючого засобу при температурі 60 °С, після цього декілька разів обполіскують водою очищеною. Внутрішні поверхні обладнання, що знаходиться у приміщеннях С, D класів чистоти обробляють водою питною, при необхідності – розчином миючого засобу 0,5% при температурі 60 °С. Фільтри, які піддаються регенерації, промивають у мильній воді з дезінфекційним засобом.

Регенерація іонообмінної смоли проходить за використання 10% розчину хлориду натрію, отриманого на ДР 1.2.6. Після отримання певної кількості води відбувається автоматична регенерація іонообмінних смол. Спочатку зважені солі вимиваються із фільтру вихідною водою. Далі для

					ДП 6222. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		73

регенерації використовують гарячий розчин хлориду натрію 40 °С, таким чином видаляють іони, пов'язані з іонообмінною смолою. Регенерація Na-катіоніту досягається фільтруванням через нього зі швидкістю 3 ... 4 м/год хлористого натрію.

З установки пом'якшення питною водою видаляється розчин солі. Відокремлені забрудники та відпрацьований розчин для регенерації смоли відводяться у каналізацію.

Регенерація вугілля для очищення води проводиться термічним методом, який полягає у випалюванні адсорбованих органічних сполук у спеціальних печах при температурі 800-900°С. У відновленому вугіллі контролюють такі параметри:

- рН водного витягу повинен бути в межах 4,5–5,0;
- хлориди, сульфати, солі кальцію і важких металів, вміст солей заліза не більше за 0,003%.

ДР 1.4.2 Перевірка обладнання на герметичність

Ретельна стерилізація може не дати ефекту, якщо порушено герметичність устаткування. Для перевірки ємнісного обладнання на герметичність необхідно створити надлишковий тиск 0,5 МПа і впродовж 30 хвилин спостерігати покази тиску на манометрі. Обладнання вважають герметичним, якщо покази залишаються сталими впродовж цього періоду.

Особлива увага приділяється фланцевим з'єднанням та ущільненню кришок ємнісного обладнання. Для їх перевірки використовують мильну воду при надлишковому тиску 0,5 МПа. За виявлення нещільних з'єднань необхідним є проведення розбору та профілактичного ущільнення обладнання та комунікації. З'єднання підтягують та перепакуюють, а для обладнання проводять підтягування кришок або з'єднань. У випадку необхідності проводять заміну ущільнюючих прокладок люків та кришок.

Усі вентилі перед установкою перевіряють гідравлічним опресуванням при тиску 0,3 МПа. Для герметизації фланців і вентилів використовують особливі прокладки з параніту, обробленого графітом, для герметизації

					ДП 6222. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		74

кришок апаратів застосовують шнур із прогумованої тканини діаметром до 19 мм, а для завантажувальних люків – гуму товщиною 14 мм. Покази манометру при створених стисках в обладнанні та прилягаючих комунікаціях повинні залишатися сталими.

ДР 1.4.3 Стерилізація обладнання

Відповідно до вимог GMP, де це можливо, слід використовувати системи «очищення на місці» та «обробка паром на місці» («стерилізація на місці»). Перед стерилізацією апаратуру та комунікації промивають питною водою з магістрального трубопроводу температурою 100 °С.

Для видалення з ємнісного обладнання повітря при стерилізації гостру пару подають під кришку ферментеру, видаляючи повітря через барботер. Видалення повітря через нижній штуцер забезпечує досягнення потрібної температури стерилізації швидше, ніж при видаленні пароповітряної суміші через верхній штуцер.

Досягти стерильності можна обробкою обладнання та комунікацій насиченою водяною паром при 125-145°C, що гарантує досягнення необхідного рівня асептичності.

Порожні апарати і прилеглі до них комунікації стерилізуються при температурі 120-126 °С впродовж 1 год під надлишковим тиском 0,3 МПа.

Особлива увага приділяється стерилізації апаратури й комунікації для подачі піногасника. Стерилізацію цих вузлів проводять при 125-135°C на протязі 1,5-2 год за тиску 0,3 МПа.

Наведена тривалість стерилізації не враховує час, який витрачається на видалення повітря та на прогрівання ємнісного обладнання.

Стерилізацію повітряних фільтрів і прилеглих комунікацій проводять одночасно зі стерилізацією виробничого обладнання, причому відпрацьована пара від фільтрів надходить у ферментер. Стерилізація фільтрів проходить насиченою гострою паром за температури 110 °С впродовж 2 год під надлишковим тиском 0,4 МПа.

					ДП 6222. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		75

Фільтр фінішної очистки не витримує термічну стерилізацію, тому його стерилізують хімічним способом. Для цього всередині стерильної ділянки трубопроводу установлюють вентиль. Сам фільтр і ділянку від нього до вентилля стерилізують за допомогою оксиду етилену та формаліну. Ділянку від вентилля до ферментера стерилізують гострою парою разом з апаратом.

Завершують стерилізацію півгодинним пропарюванням пробовідбірників, посівного штуцеру та зливної лінії ферментеру до трапу.

На стадії стерилізації контролюються показники температури, тиску насиченої пари, тривалість стерилізації, присутність сторонньої мікрофлори.

Установка ліофільної сушки повинна стерилізуватись перед кожним її завантаженням. Необхідно строго встановити максимальний період часу між стерилізацією і початком циклу ліофілізації. Дезінфекція не повинна розглядатися як заміна стерилізації.

ДР 2 Підготовка повітря

ДР 2.1 Підготовка вентиляційного повітря

Очищення приливної повітря, яке подається у приміщення класу чистоти С, може бути двоступінчастим, а у приміщення класу В(А) – лише триступінчастим. У приміщення класу D можуть подавати повітря, очищене фільтрами першого ступеня.

ДР 2.1.1 Забір повітря

Підготовка вентиляційного повітря починається після його забору з атмосфери. Забір здійснюється допомогою трубчастих конструкцій. Повітрозбірник встановлений на висоті 8-10 метрів у місцях з найменшою запиленістю та загазованістю.

ДР. 2.1.2 Попередня очистка повітря

На I ступені очистки використовують фільтр ячеювий гофрований типу ФяГ. Попередня очистка (G3-G4) звільняє повітря від механічних частинок, серед яких наявний як пил, так і краплі вологи та, частково, мікроорганізми. Цей фільтр встановлюється на всмоктувальній лінії перед

					ДП 6222. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		76

компресором та дозволяє видалити частки розміром більше 5 мкм. Ефективність фільтрації становить 80-90%.

Коефіцієнт проскоку становить 10% від загального вмісту механічних частинок. Для контролю аеродинамічного супротиву фільтрів в процесі їх експлуатації до та після фільтру встановлені манометри, які приєднані до штуцерів, що знаходяться на стінках повітроочисних камер.

Технічне обслуговування такого фільтру являє собою виявлення перепадів тиску, що є вищими за рекомендовані, та подальшу заміну фільтру, оскільки фільтри даного типу не підлягають регенерації. Фільтр витримує термічну стерилізацію.

Повітря цього ступеню очистки є придатним для використання у приміщенні класу D.

ДР 2.1.3 Транспортування повітря

Транспортування повітря супроводжується його стисканням, після чого воно направляється в систему повітропостачання. Метою цієї стадії є необхідність забезпечення належного об'єму повітря з тиском, який відповідає технологічним вимогам. Нагнітання повітря забезпечується компресором.

Компресор спричинює адіабатне стискання повітря до тиску 0,2 МПа, і, як наслідок, відбувається його нагрівання до 120 °С.

ДР 2.1.4 Кондиціонування повітря

Очищене від механічних частинок повітря поступає у центральний кондиціонер, де поступово нагрівається в секції нагрівача, охолоджується в секції охолоджувача та далі знову нагрівається до 18-20 °С. Нагріте повітря поступає на парозволожувач. Повітря від парозволожувача надходить далі на фільтр тонкої очистки.

ДР 2.1.5 Тонка очистка повітря

II ступінь підготовки повітря (F5-F9) забезпечується фільтром типу ФПП, який встановлюється безпосередньо перед повітряроздавальним пристроєм та призначений для тонкої фільтрації повітря від бактерій і

					ДП 6222. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		77

твердих домішок при концентрації пилу 0,5 мг/м³. Ефективність очищення повітря на даному етапі становить 95-98%. Перед та після фільтру встановлені манометри для виявлення перепадів тиску.

Повітря цього ступеню очистки є придатним для використання у приміщенні класу С.

ДР 2.1.6 Високоефективна очистка повітря

Отримане на фільтрі другого ступеню очистки повітря надходить на фільтр III ступеню очистки – високоефективний.

Повітря поступає в чисті приміщення різних класів В(А), С, D, які, в свою чергу, обладнані високоефективними фільтрами фінішної очистки (U15-U17). Очистка здійснюється стерилізаційним повітряним фільтром, який встановлений безпосередньо в місці подачі повітря в робочу зону.

Для остаточної очистки повітря від частинок, що містяться в ньому і мікрофлори застосовують фільтр типу “Лаік”. Як фільтрувальний матеріал у ньому використовують ультратонке волокно з перхлоровінілової смоли. Цей матеріал гідрофобний, стійкий до хімічно-агресивних середовищ і може експлуатуватися за температури не вище 60 °С і відносній вологості до 100%. Ефективність очистки повітря на цьому етапі складає 99,999995%. Перед та після фільтру встановлені манометри для виявлення перепадів тиску.

Повітря цього ступеню очистки є придатним для використання у приміщенні класу В(А). Відносна вологість повітря на виході становить 45±5%, а температура – 20±2 °С.

ДР 2.2 Підготовка стерильного аераційного повітря

Технологія отримання стерильного повітря включає фільтраційну очистку з відділенням сконденсованих в охолоджену зжату повітрі парів вологи.

ДР 2.2.1 Забір повітря

Атмосферне повітря забирають на висоті 8-10 м повітрозбірником аналогічно до ДР 2.1.1.

					ДП 6222. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		78

ДР 2.2.2 Попереднє очищення повітря та його стиснення

Попередня очистка необхідна для захисту компресору від передчасного зносу. Тут повітря очищується від крупних частинок та пилу на фільтрі попередньої очистки. На цій стадії з повітря видаляється основна маса великих часток пилу розміром 5-10 мкм. В якості фільтрів попереднього очищення застосовуються губчасті фільтри з модифікованого пінополіуретану. Ефективність вловлювання атмосферного пилу на пінополіуретані становить 85%, його пилоємність – 0,2 кг/м². Гранична робоча температура використання пінополіуретану дорівнює 121 °С. Перед та після фільтру встановлені манометри для контролю перепаду тиску.

Механічно очищене повітря надходить у компресор, де здійснюється його адіабатне стискання до тиску 0,3 МПа. Такий тиск потрібний для здолання гідродінамічного опору в системі транспортування повітря та стовпа культуральної рідини у ферментері. Стиснене повітря розігрівается до 150 °С.

ДР 2.2.3 Охолодження повітря та згладжування коливань витрат

Стиснення повітря супроводжується сильним нагріванням, тому, після компресору, повітря надходить у теплообмінник трубчатого типу для охолодження. Холодоносієм виступає вода питна. Щоб видалити з повітря зайву вологу, його необхідно охолоджувати нижче крапки роси. Повітря охолоджується до робочої температури 37 °С в водяному теплообміннику, в результаті чого конденсуються наявна у повітрі водяна пара. Конденсат видаляється з системи, і загальний вміст вологи в повітрі зменшується на 50-70%.

Перед фільтрами встановлений ресивер, який слугує для вирівнювання тиску в системі, забезпечення рівномірної подачі повітря на фільтри, видалення крапель вологи та масляного туману. Охолоджене у теплообміннику повітря надходить у ресивер. Крапельна волога, яка утворилась під час охолодження, уловлюється при проходженні повітря через ресивер при багатократній зміні напрямку руху під час його контакту з

					ДП 6222. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		79

насадкою ресивера. Конденсат відводиться у каналізацію. Повітря з ресиверу виходить під тиском 0,3 МПа. Для його охолодження використовують кожухотрубчастий теплообмінник з нерухомими трубними решітками. Вологість повітря на виході становить 60%.

ДР 2.2.4 Очищення повітря на головному фільтрі

В головному фільтрі повітря очищується від мікробних клітин 1-1,5 мкм не менш ніж на 98% (число клітин не повинно бути більшим за 10 на 1 м³ очищеного в фільтрі повітря). Для очищення повітря на цій стадії застосовується фільтруючі матеріали з поліамідних волокон. Ефективність роботи фільтру контролюється різницею тисків до та після фільтру манометрами.

ДР 2.2.5 Очищення повітря на індивідуальному фільтрі

Для тонкого очищення повітря використовують індивідуальні фільтри, які повинні забезпечувати очищення повітря від часток діаметром 0,3 мкм на 99,999995%. Фільтри цього ступеню стерилізують хімічним способом разом з прилягаючими комунікаціями. У промисловості найчастіше у фільтрах тонкої очистки використовуються тонковолокнисті фільтруючі матеріали. Вони дешеві та мають малий гідравлічний опір (0,01-0,03 МПа) і велику пилоємність.

Очищене стерильне повітря надходить у барботери посівного апарату та ферментеру, а також на стадію сублімаційного висушування. Температура на виході становить 37 °С.

ДР 3 Підготовка води очищеної

Вода питна використовується при початковому промиванні обладнання, флаконів та закупорювальних засобів, для миття приміщень.

Вода очищена використовується для приготування компонентів поживних та захисних середовищ, при заключному промиванні обладнання всередині, при фінальному митті флаконів та закупорювальних засобів.

Вода очищена готується з води питної, яка має відповідати вимогам ДСанПіН 2.2.4-171-10 «Гігієнічні вимоги до води питної, призначеної для

					ДП 6222. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		80

споживання людиною». Вода питна є прийнятим джерелом вихідної води для одержання води фармакопейної якості.

Вода очищена виготовляється згідно СТ-Н МОЗУ 42-3.7:2013. Вода очищена використовується у процесі виробництва препаратів, при виробництві яких не висуваються вимоги щодо стерильності та/або апірогенності.

ДР 3.1 Підігрів і термостатування

Для отримання води очищеної вода питна водопровідна по трубопроводу потрапляє у теплообмінник, оснащений рубашкою для забезпечення необхідного температурного режиму. Вода питна нагрівається до 20 °С – це дозволяє підтримувати пропускну спроможність мембрани зворотнього осмосу на доцільному рівні.

ДР 3.2 Грубе очищення води

Нагріта вода питна, за допомогою насосу постійного тиску і продуктивності, потрапляє на фільтрування. Груба фільтрація забезпечується дисковим фільтром діаметром пор 100 мкм. Вода звільняється від різноманітних крупних механічних домішок. В якості устаткування для грубої фільтрації використовуються фільтри з піщаним завантаженням.

Справність фільтру контролюється різницею тисків води до та після фільтру, які мають становити $0,6 \pm 0,01$ МПа.

ДР 3.3 Пом'якшення води на іонообінній смолі

Очищена від механічних домішок вода потрапляє на фільтр-пом'якшувач двокорпусний іонообмінний модуль, де пом'якшується за допомогою кислого катіоніту. Жорсткість води знижується за рахунок видалення іонів кальцію і магнію, це дозволяє значно знизити вміст іонів перед подачею води на мембрану зворотнього осмосу.

В іонообмінному модулі встановлена макропориста смола, з якої, при наступній регенерації, легко видаляються забруднення. Така фільтрація дозволяє знизити відсоток органіки у воді на 60-70%.

					ДП 6222. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		81

У випадку, якщо вода питна водопровідна не відповідала вимогам стосовно жорсткості, то, після такого пом'якшення, вона може бути використана у технологічних процесах. Справність роботи пом'якшувача можна контролювати періодичним виміром жорсткості води на вході і на виході. При двоступінчастому пом'якшенні жорсткість води на виході становить – до 0,01 мг-екв/л. Вимірюють жорсткість TDS-метром.

ДР 3.4 Фільтрація води пом'якшеної через вугільний фільтр

Отримана пом'якшена вода подається на фільтр тонкої очистки з діаметром пор 5 мкм. Використовуються стандартні патронні фільтри з активованим вугіллям. Фільтр працює без зміни наповнювача біля одного року. Матеріал, вугілля активоване, підлягає щоквартальному контролю на вміст хлору.

На цій стадії вдається знизити у воді концентрацію органічних сполук та хлору. Тиск рідини перед фільтром та після нього має бути 0,6 МПа. Цей показник контролюється манометром.

ДР 3.5 Очищення води у системі зворотнього осмосу

Насос постійного тиску та продуктивності забезпечує подачу води на зворотньоосматичний модуль. Затримуюча здатність установки зворотнього осмосу становить 99,6%. Видалення домішок відбувається за рахунок пропускання води через напівпроникну мембрану при тиску, що перевищує осмотичний. Устаткування являє собою систему мембран з розміром пор 0,0005-0,001 мкм. Контроль системи зворотнього осмосу здійснюється виміром питомої електропровідності води на виході з системи. Питома електропровідність води очищеної складає 4,3 $\mu\text{S}/\text{cm}$ при температурі 20 град.

Концентрат, що виходить з установки зворотного осмосу, має досить високий тиск і його транспортування до місця скидання або утилізації не викликає особливих труднощів. Відокремлений концентрат скидається в каналізацію. На місцевому трубопроводі, перед входом у магістральний, встановлені манометр та витратомір сталого перепаду. Після установки

					ДП 6222. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		82

зворотнього осмосу встановлений витратомір сталого перепаду. Очищена від органічних сполук та знесолена таким чином вода надходить у збірник для води очищеної.

ДР 3.6 Надходження води очищеної у збірник

Збірник обладнаний сорочкою для регулювання температури. Температура води очищеної на виході складає 20 °С, контрольний прилад для її регулювання – термомеперетворювач. Збірник оснащений датчиком безперервного контролю рівню води.

На виході зі збірнику встановлюється циркуляційний насос, а тиск води на виході з насоса контролюється манометром. У разі необхідності після виходу з насоса вода повертається у збірник через місцевий трубопровід де, перед входом через відповідний штуцер у збірник, встановлені модуль вимірювання питомої електропровідності і температури води та термомеперетворювач, а для визначення об'ємної витрати рідини за одиницю часу після них встановлений ротаметр.

Контроль рівня води, що міститься в збірнику, здійснюється автоматичними датчиками рівня. Залежно від кількості накопиченої води автоматично запускається або відключається її виробництво. При мінімальному вмісті води в збірнику запускається режим заборони на її подальше використання. Температурний датчик на кільцевому трубопроводі оперативно (online) контролює температуру води і при її підйомі вище 20 °С, що відбувається внаслідок тривалої роботи циркуляційного насоса і при відсутності витрати води протягом тривалого часу, запускає систему скидання. Температура знижується за рахунок подальшого отримання води очищеної.

Збірник оснащений лампами ультрафіолетового світіння, правильність роботи яких контролюється по її випромінюючій здатності. Відбувається фотохімічне окиснення води УФ-променями з довжинами хвиль 185 і 245 нм, що усуває сліди органічних сполук і вбиває мікроорганізми у воді. УФ-

					ДП 6222. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		83

промені довжиною хвилі 254 нм використовується для запобігання розмноження бактерій у збірнику.

У воді очищеній контролюють загальне число життєздатних аеробних мікроорганізмів. Для простежування несприятливих тенденцій установлюють попереджувальну межу і межу, що вимагає вживання заходів. У нормальних умовах підхожою межею, що вимагає вживання заходів, є вміст 100 життєздатних аеробних мікроорганізмів в 1 мл. Визначення проводять методом мембранної фільтрації. Використовують густе поживне середовище, яке далі інкубують при температурі від 30 °С до 35 °С впродовж 5 діб. Кількість зразка для випробування відбирають залежно від передбачуваного результату.

Готова очищена вода від збірника поширюється трубопроводом на відповідні технологічні процеси.

ДР 4. Підготовка поживних та захисних середовищ і допоміжних речовин

Всі операції відбуваються у приміщенні класу чистоти В.

ДР 4.1. Підготовка поживного середовища для отримання посівного матеріалу в пробірках та у колбах

Поживне середовище на даній стадії готується з розрахунку на 9 пробірок та 5 колб. У качалочні колби об'ємом 1 л вносять по 600 мл середовища, а у пробірки на 50 мл – по 30 мл. На даній стадії необхідно приготувати загалом 3270 мл поживного середовища.

Розчин 1, г/л:

- кукурудзяне борошно – 75;
- крохмаль – 20.

Розчин 2, г/л:

- крейда – 14;
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,5.

					ДП 6222. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		84

ДР 4.1.1 Приготування та стерилізація розчину 1

245,25 г кукурудзяного борошна та 65,4 г крохмалю заважують на електронних вагах та вносять наважки в колбу, вміст колби заливають 1455 мл гарячої очищеної води. Суміш ретельно перемішують до повної гомогенізації. Колбу поміщають в автоклав та стерилізують впродовж 30 хв при температурі 112 °С і тиску 0,11 МПа.

ДР 4.1.2 Приготування та стерилізація розчину 2

1,635 г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ та 45,78 г крейди зважують на електронних вагах та вносять в колбу. Для розчинення компонентів в колбу заливають 1455 мл води очищеної, утворену суміш перемішують. Утворений розчин поміщають в автоклав та стерилізують за температури 121 ± 1 °С при тиску 0,1 МПа впродовж 25 хв.

ДР 4.1.3 Об'єднання простерилізованих розчинів

Після стерилізації утворені розчини зливають в колбу об'ємом 5 л та перемішують її вміст. Готове середовище розливають у 6 качалочних колб об'ємом 1 л та у чотири пробірки об'ємом 50 мл по 30 мл.

Контроль мікробіологічної чистоти середовища проводять шляхом висіву проб на чашки Петрі з подальшим їх інкубуванням у термостаті.

ДР 4.2 Підготовка поживного середовища для вирощування посівного матеріалу у посівних апаратах та ферментерах

Враховуючи наявність двох посівних апаратів об'ємами 0,025 м³ і 0,01 м³ та коефіцієнтом заповнення 0,52, а також двох ферментерів об'ємами 0,25 м³ і 0,1 м³ та коефіцієнтом заповнення 0,62, необхідним є приготування 231 л поживного середовища.

Розчин крейди та $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (розчин 1) та розчини крохмалю та кукурудзяного борошна (розчин 2) готують та стерилізують в окремих реакторах. Простерилізовані розчини подаються через дозатор в посівні апарати та виробничі ферментери.

Розчин 1, г/л:

– кукурудзяне борошно – 75;

					ДП 6222. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		85

– крохмаль – 20.

Розчин 2, г/л:

– крейда – 14;

– $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,5.

ДР 4.2.1 Приготування та стерилізація розчину 1

За допомогою дозатору поступово загрузають у реактор кукурудзяне борошно і крохмаль. Утворена суміш ретельно перемішується мішалкою при 50-60 об/хв з попереднього внесеною в апарат водою очищеною, яка була нагріта до 30 °С, щоб запобігти утворенню крупних грудок, які можуть стати причиною порушення стерильності.

Гомогенізовані суміші стерилізують за температури 112 °С протягом 30 хв та при тиску 0,15 МПа. По завершенню цього періоду простерилізоване середовище охолоджують через сорочку питною водою до температури 37 °С.

ДР 4.2.2 Приготування та стерилізація розчину 2

Для приготування розчину крейди та $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ в реактор поступово через дозатор вносяться наведені компоненти у відповідних кількостях. У реактор додають воду очищену та перемішують його вміст при 30-40 об/хв. Стерилізують утворений розчин при температурі 131 °С протягом 1 год за тиску 0,1 МПа. По завершенню цього періоду простерилізоване середовище охолоджують через сорочку питною водою температурою 37 °С.

ДР 4.2.3 Внесення розчинів у посівні апарати та у ферментери

У посівні апарати та виробничі ферментери вносять готові розчини 1 та 2 від ДР 4.2.1 та ДР 4.2.2 та гомогенізують вміст апаратів мішалками за 30-40 об/хв.

Контроль мікробіологічної чистоти середовища проводять шляхом висіву проб на чашки Петрі з подальшим їх інкубуванням у термостаті.

ДР 4.3 Приготування та стерилізація захисного середовища

					ДП 6222. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		86

Захисне середовище складається з сахарози, желатину та сухого знежиреного молока. Простерилізовані розчини подаються через дозатор в реактор з культуральною рідиною.

ДР 4.3.1 Приготування та стерилізація розчину сахарози

У реактор з водою очищеною через дозатор вносять сахарозу. Температура води становить 60-80 °С, що сприяє її розчиненню. Вміст реактору перемішують при 30-40 об/хв до тих пір, поки сахароза повністю не розчиниться. Розчин стерилізують за температури 100 °С та тиску 0,05 МПа протягом години глухою парою, яка надходить у сорочку реактору. Простерилізований розчин охолоджують через сорочку питною водою до температури 30 °С.

ДР 4.3.2 Приготування та стерилізація розчину желатину

У реактор з очищеною водою через дозатор вносять желатин. Вміст реактору нагрівається до 50-60 °С для розчинення желатину та перемішується мішалкою при 30-40 об/хв. Процес припиняють, коли желатин повністю набухає. Утворений розчин желатину стерилізують за температури 100 °С та тиску 0,05 МПа глухою парою через сорочку реактору протягом години. Стерильний розчин охолоджують до 30 °С питною водою через сорочку.

ДР 4.3.3 Приготування та стерилізація розчину знежиреного молока

У реактор з очищеною водою через дозатор вносять сухе знежирене молоко (СЗМ), відновлюючи його. Вміст реактору нагрівається до 65-75 °С та перемішується до гомогенізації його вмісту при 30-40 об/хв. Відновлене молоко впродовж години стерилізують за температури 120-122 °С та тиску 0,05 МПа глухою парою через сорочку реактору. Отриманий стерильний розчин охолоджують до 30 °С.

ДР 4.4 Підготовка та стерилізація піногасника

У якості піногасника використовують олеїнову кислоту. Витрати піногасника складають 0,2% від об'єму культуральної рідини. Олеїнову кислоту вносять у збірник та стерилізують при тиску 0,1 МПа за температури

					ДП 6222. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		87

120-122 °С впродовж 2 год. Отриманий стерильний піногасник охолоджують до 37 °С.

Контроль мікробіологічної чистоти піногаснику проводять шляхом висіву проб на чашки Петрі з подальшим їх інкубуванням у термостаті.

ДР 4.5 Підготовка і стерилізація допоміжних розчинів

Готують розчини для регулювання рН. В колбу з 994 мл води очищеної вносять 6 г HCl, перемішують вміст колби і отримують 6% розчин HCl.

Для приготування розчину NaOH концентрації 10% в колбу з 990 мл води очищеної вносять 10 г NaOH і перемішують її вміст.

ДР 5 Підготовка флаконів і закупорювальних засобів

Перед миттям флакони та гумові кришечки перевіряють на цілісність. Процес підготовки флаконів починається із їх замочування, миття зовнішньої і внутрішньої поверхонь. При замочуванні мийний розчин поверхнево-активних речовин піддає деструкції частинки забруднень, що веде до їх відшаровування з поверхні скла і видалення. Спершу миють внутрішню поверхню флаконів, механічно очищуючи забруднення.

Миття зовнішньої і внутрішньої поверхонь флаконів здійснюється із застосуванням типового устаткування – лінії АЛВ, де використовується шприцевий метод миття. Здійснюється миття внутрішньої поверхні (апарат АЛВ-I), обполіскування поверхонь гарячою питною водою (карусельна мийна машина АЛВ-II), чотирьохпозиційне миття з обполіскуванням флаконів водою очищеною (ланцюгова мийна машина АЛВ-III).

Після миття флакони надходять на стерилізацію. Для цього використовують сушильно-стерилізаційні установки тунельного типу, де флакони проходять три зони: нагрівання до температури стерилізації (315 ± 35 °С), витримку при заданій температурі впродовж 15-30 хвилин і охолодження профільтрованим через фільтр тонкого очищення стерильним повітрям. Як типове устаткування виступає стерилізаційний тунель АЛВ-IV.

					ДП 6222. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		88

Для підготовки пробок використовують поліфункціональне устаткування з програмним управлінням, що дозволяє здійснювати всі операції в одному апараті.

Пробки відмиваються від гумової крихти, миють у розчині мийного засобу, кип'ятять у розчині натрію двовуглекислого. Після кожної операції обполіскують пробки спочатку питною водою, а потім – водою очищеною.

Стерилізацію пробок проводять насиченою парою у стерилізаторах із їх подальшим висушуванням стерильним повітрям.

Для підготовки пробок використовується автоматична лінія, що поєднує усі операції миття і стерилізації “Фарма-Клін”. Стерильні флакони і пробки вивантажують у стерильні ємності з кришками і зберігають у чистій зоні з навколишнім середовищем якнайменше класу D не більше 24 годин.

ТП 6 Підготовка посівного матеріалу

Процес відбувається у приміщеннях класу чистоти В.

*ТП 6.1 Відновлення ліофілізованої культури *B. subtilis**

У флакон з ліофілізованою культурою *B. subtilis* з дотриманням правил асептики вносять 6 мл середовища, приготованого на ДР 4.1. Розчиняють вміст флакону та здійснюють пересів утвореної суспензії у 6 пробірок з тим самим середовищем. Пробірки інкубують в термостаті за температури 37 °С протягом 20 годин. Температуру контролюють за допомогою термометру, а регулюють – за допомогою термостатичного прибору.

Контролюють морфологію клітин шляхом мікроскопії мазків, пофарбованих за методом Грама та визначають активність тест-культур. Контролюють стерильність матеріалу, використовуючи поживні середовища для контролю бактерій та грибів.

*ТП 6.2 Вирощування посівного матеріалу *B. subtilis* в колбах на качалках*

Отриману клітину суспензію з дотриманням правил асептики вносять у 3 колби об'ємом 1 л по 60 мл в кожну. Колби містять по 600 мл поживного середовища.

					ДП 6222. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		89

Вирощування проводять на качалках в автоклаві при 200-220 об/хв та температурі 37 °С впродовж 16-24 год. Завершення культивування визначають по досягненню рН 7,2-7,6 та по повному використанню глюкози і рясному спороутворенню. Кількість бактерій виявляють методом десятикратних розведень з висівом на чашки Петрі. В 1 см³ культуральної рідини має бути не менш як 10¹⁰ клітин.

Отриманий посівний матеріал контролюють на відсутність контамінуючої мікрофлори посівом на МПА та мікроскопіюванням.

*ТП 6.3 Вирощування посівного матеріалу *B. subtilis* в посівному апараті*

В посівний апарат об'ємом 0,025 м³, з охолодженням до 37 °С стерильним поживним середовищем, через простерилізований штуцер вносять 1,98 л посівного матеріалу з колб. Коефіцієнт заповнення посівного апарату складає 0,62. Одразу після засіву проводять мікробіологічний контроль.

Процес вирощування посівного матеріалу відбувається за температури 37±1 °С при постійному перемішуванні (не менш 500 об/хв) за допомогою відкритої турбінної мішалки. Температура підтримується за допомогою подачі насиченої водяної пари у сорочку апарата.

Посівний апарат оснащений барботером для забезпечення необхідного рівня аерації – не менш як 0,7 м³ повітря на 1 м³ середовища за 1 хв. Оптимальний час вирощування становить 24 год. За необхідністю подають всередину апарату піногасник від ДР 4.4. Тиск в середині апарату становить (0,1±0,05) МПа. рН середовища на момент завершення культивування має становити 7,2-7,6, його коригують впродовж процесу розчинами від ДР4.5.

Біомасу контролюють за показником оптичної густини при довжині хвилі 540 нм та за концентрацією живих клітин – по методу Коха. Рівень спороутворення контролюють мікроскопіюванням (фарбуванням за Цілем-Нільсеном). Відсутність контамінуючої мікрофлори контролюється виконанням посівів на МПА з наступним мікроскопіюванням.

Після закінчення процесу вирощування культуральна рідина стерильно передається у ферментер.

					ДП 6222. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		90

*ТП 6.4 Відновлення ліофілізованої культури *B. licheniformis**

У флакон з ліофілізованою культурою *B. licheniformis* з дотриманням правил асептики вносять 3 мл середовища, приготованого на ДР 4.1. Розчиняють вміст флакону та здійснюють пересів утвореної суспензії у 3 пробірки з тим самим середовищем. Пробірки інкубують в термостаті за температури 37 °С протягом 20 годин. Температуру контролюють за допомогою термометру, а регулюють – за допомогою термостатичного прибору.

Контролюють морфологію клітин шляхом мікроскопії мазків, пофарбованих за методом Грама та визначають активність тест-культур. Контролюють стерильність матеріалу, використовуючи поживні середовища для контролю бактерій та грибів.

*ТП 6.5 Вирощування посівного матеріалу *B. licheniformis* в колбах на качалках*

Отриману клітину суспензію з дотриманням правил асептики вносять у 2 колби об'ємом 1 л по 60 мл в кожную. Колби містять по 600 мл поживного середовища.

Вирощування проводять на качалках в автоклаві при 200-220 об/хв та температурі 37 °С впродовж 16-24 год. Завершення культивування визначають по досягненню рН 8,0-8,5 та по повному використанню глюкози і рясному спороутворенню. Кількість бактерій виявляють методом десятикратних розведень з висівом на чашки Петрі. В 1 см³ культуральної рідини має бути не менш як 10¹⁰ клітин.

Отриманий посівний матеріал контролюють на відсутність контамінуючої мікрофлори посівом на МПА та мікроскопіюванням.

*ТП 6.6 Вирощування посівного матеріалу *B. licheniformis* в посівному апараті*

В посівний апарат об'ємом 0,01 м³ з охолодженням до 37 °С стерильним поживним середовищем через простерилізований штуцер вносять 1,2 л

					ДП 6222. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		91

культуральної рідини з колб. Коефіцієнт заповнення посівного апарату складає 0,52. Одразу після засіву проводять мікробіологічний контроль.

Процес вирощування посівного матеріалу відбувається за температури 37 ± 1 °C при постійному перемішуванні (не менш 320 об/хв) за допомогою відкритої турбінної мішалки. Температура підтримується за допомогою подачі насиченої водяної пари у сорочку апарата. Тиск в середині апарату становить $(0,1 \pm 0,05)$ МПа. рН середовища на момент завершення культивування має становити 8,0-8,5, його коригують впродовж процесу розчинами від ДР4.5.

Посівний апарат оснащений барботером для забезпечення необхідного рівня аерації – не менш як 0,4 м³ повітря на 1 м³ середовища за 1 хв. Оптимальний час вирощування становить 28 год. За необхідністю подають всередину апарату піногасник.

Біомасу контролюють за показником оптичної густини при довжині хвилі 540 нм та за концентрацією живих клітин – по методу Коха. Рівень спороутворення контролюють мікроскопіюванням (фарбуванням за Цілем-Нільсеном). Відсутність контамінуючої мікрофлори контролюється виконанням посівів на МПА наступним мікроскопіюванням.

Після закінчення процесу вирощування культуральна рідина стерильно передається у ферментер.

ТП 7. Виробниче культивування

Процес відбувається в приміщенні класу чистоти В.

*ТП 7.1 Культивування *B. subtilis* у виробничому ферментері*

Культуральна рідина, отримана на стадії ТП 6.3, через систему стерильних комунікацій потрапляє у виробничий ферментер, з 135 літрами охолодженого до 37 °C стерильного поживного середовища, у кількості 15 л. Посівний матеріал має містити не менш як 0,5 млн живих бактерій на 50 дм³. Об'єм ферментеру становить 0,25 м³. Коефіцієнт заповнення апарату складає 0,62.

					ДП 6222. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		92

Культивування протікає за температури 37 ± 1 °С, яка підтримується за допомогою подачі насиченої водяної пари у сорочку апарату. Процес проходить при постійному перемішуванні – не менш 500 об/хв за допомогою відкритої турбінної мішалки. Барботер забезпечує аерацію середовища – не менш як $0,7 \text{ м}^3$ повітря на м^3 середовища за 1 хв. Тиск всередині апарату підтримують на рівні $0,1 \pm 0,05$ МПа.

За необхідністю у середовище додають піногасник, підготовлений на ДР 4.4. Оптимальний час культивування становить від 26 до 36 год. Процес культивування припиняється при досягненні не менш як 50% спор у середовищі. рН середовища на момент завершення культивування має становити 7,2-7,6 його коригують впродовж процесу розчинами від ДР 4.5. Культуральна рідина має містити не менш як $1,101 \times 10^9$ живих бактерій на 1 см^3 .

Біомасу контролюють за показником оптичної густини за довжини хвилі 540 нм, концентрацією живих клітин – по методу Коха. Рівень спороутворення контролюють мікроскопіюванням (фарбуванням за Цілем-Нільсеном). Відсутність контамінуючої мікрофлори контролюється виконанням посівів на МПА наступним мікроскопіюванням.

*ТП 7.2 Культивування *B. licheniformis* у виробничому ферментері*

Культуральна рідина, отримана на стадії ТП 6.6, через систему стерильних комунікацій потрапляє у виробничий ферментер, з 45 літрами охолодженого до 37 °С стерильного поживного середовища, у кількості 5 л. Посівний матеріал має містити не менш як 0,5 млн живих бактерій на 50 дм^3 . Об'єм ферментеру становить $0,1 \text{ м}^3$, а коефіцієнт заповнення – 0,52. Культивування протікає за температури 37 ± 1 °С, яка підтримується за допомогою подачі насиченої водяної пари у сорочку апарату. Процес протікає при постійному перемішуванні – не менш 320 об/хв за допомогою відкритої турбінної мішалки. Барботер забезпечує аерацію середовища – не менш як $0,4 \text{ м}^3$ повітря на м^3 середовища за 1 хв. Тиск в середині апарату підтримують на рівні $0,1 \pm 0,05$ МПа.

					ДП 6222. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		93

За необхідністю у середовище додають піногасник, що був підготовлений на ДР 4.4. Оптимальний час виробничого біосинтезу становить від 26 до 36 год. Процес культивування припиняється при досягненні не менш як 50% спор у середовищі. рН середовища на момент завершення культивування має становити 8,0-8,5, його коригують впродовж процесу розчинами від ДР4.5.

Культуральна рідина має містити не менш як $0,352 \times 10^9$ живих бактерій на 1 см^3 .

Біомасу контролюють за показником оптичної густини при довжині хвилі 540 нм та за концентрацією живих клітин – по методу Коха. Рівень спороутворення контролюють мікроскопуванням (фарбуванням за Цілем-Нільсеном). Відсутність контамінуючої мікрофлори контролюється виконанням посівів на МПА наступним мікроскопіюванням.

ТП 8 Поєднання культуральних рідин *B. subtilis* та *B. licheniformis*

Культуральні рідини *B. subtilis* та *B. licheniformis* по стерильним трубам перекачують у реактор, об'єднуючи їх у співвідношенні 3:1. Культуральну рідину охолоджують через сорочку реактору до 8°C . В 5 мл культуральної рідини перед додаванням захисного середовища має міститися не менше $1,76 \times 10^9$ КУО.

ТП 9 Змішування культуральної рідини з захисним середовищем

Для підвищення якості препарату та зменшення виробничого браку в реактор з об'єднаними культуральними рідинами вносять захисне середовище від ДР 4.3. Процес відбувається у приміщенні класу чистоти В. Кількість кріопротектору має бути такою, щоб після висушування титр сухого продукту складав $1,1 \times 10^9$ КУО. Вміст реактору перемішують до повної гомогенізації протягом 20-25 хв при 1000 об/хв за температури 8°C . Після гомогенізації в 5 мл рідини має міститися $0,97 \times 10^9$ КУО *B. subtilis* та $0,33 \times 10^9$ КУО *B. licheniformis*.

Відбирають контрольну пробу для перевірки чистоти культури. Перевіряють стерильність – відсутність сторонньої мікрофлори (бактерій та грибів), кількість живих бактерій та спор. В 5 мл має міститися не менше 1,3

					ДП 6222. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		94

$\times 10^9$ КУО, тобто не менше, ніж $0,26 \times 10^9$ КУО в 1 мл. Мікроскопують – в мазках по Граму контролюють типову морфологію клітин.

*ТП 10 Розлив рідкого напівпродукту *B. subtilis* та *B. licheniformis**

Технологічний процес відбувається у приміщенні класу чистоти В, в зоні А. Стабілізовану культуральну рідину розливають у флакони, які були підготовані на ДР 5, за допомогою стерильних дозуючих приладів для розливу, по $5,0 \text{ см}^3$. Враховуючи, що виживаність клітин при обраній технології сушіння становить 85%, один флакон перед сушінням має містити не менше $1,3 \times 10^9$ КУО. Розлив препарату йде при безперервному перемішуванні. Наповнені виробничою культурою флакони поміщають в касети, які закриваються стерильними безворсовими серветками. Серветки фіксують резинками, касети закривають кришками. Касети з флаконами передають на стадію сублімаційного сушіння напівпродукту.

Проводиться контроль наповнення флаконів на початку, в середині та в кінці розливу. У випадку невідповідності дози – перевіряється калібровка дозуючого пристрою.

ТП 11. Сублімаційне сушіння напівпродукту

Технологічний процес проводять у приміщенні класу чистоти С. У якості апарату для сушіння обрано сублімаційну установку шкафного типу.

ТП 11.1 Заморожування напівпродукту

Касети з вертикально розміщеними флаконами з напівпродуктом загрузають в апарат для глибокої заморозки, попередньо знявши з них кришки. В субліматорі напівпродукт заморожують до температури -40°C холодним розсолom і відкачують повітря. Процес заморозки триває 24 год за вказаної температури.

ТП 11.2 Сублімаційне сушіння напівпродукту

В плити субліматору подається гарячий розсіл, в результаті чого заморожена вода у напівпродукті випаровується. Випаровування проводять при температурі 34°C за тиску 26 Па. Процес сушіння триває 36 год.

					ДП 6222. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		95

Кінцева вологість висушеного препарату має становити 4%. Титр сухого продукту має становити $1,1 \times 10^9$ КУО.

Оскільки в процесі ліофілізації повітря спочатку видаляється, а потім знову вводиться в камеру, то обидві лінії виведення і введення повітря повинні бути забезпечені фінішними стерилізуючими фільтрами.

Субліматор відключають від вакуумної системи, створюючи в ньому атмосферний тиск. В камеру, де відбувалося сушіння, подіють стерильне повітря, після чого проводять вивантаження флаконів з апарату. Касети закривають кришками та передають на стадію укупорювання кінцевого продукту.

ТП 12 Укупорювання флаконів з висушеним продуктом

Укупорювання продукту відбувається в приміщенні класу чистоти В, а обтиснення алюмінієвими кришечками – у приміщенні класу чистоти С. Флакони з продуктом з дотриманням правил асептики закривають гумовими пробками.

На даній стадії контролюється відповідність зовнішнього вигляду продукту кондиційному стану. Флакони не мають бути пошкоджені, тому контролюють відсутність тріщин та сколів. У разі виявлення порушень, флакон відбраковується.

Флакони, закупорені пробками за ТУ У 25.1-00152253.037-2004, передаються через вікно передач у приміщення класу С для їх обтиснення алюмінієвими ковпачками типу К-2-20 або К-2-14 за ТУ У 25206109.001-2001. Флакони накривають кришечками та обтискають на напівавтоматі.

Впродовж процесу контролюють якість обтиснення. Флакони з нещільно прилягаючими ковпачками, включаючи ковпачки, що обертаються, тобто такі, які були нещільно обтиснені, або ж флакони з гофрами коло горловини, відбраковуються. Відбраковуванню також підлягають флакони з ушкодженням у процесі обтиснення склом – такі флакони відправляють на стадію знешкодження відходів.

					ДП 6222. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		96

Укупорені та обтисненні флакони після детального огляду завантажують у тару для передачі їх на наступну стадію – пакування, маркування та відвантаження.

ПМВ 13 Пакування, маркування та відвантаження готового продукту

Приміщення, у яких проводяться подальші операції, не класифікуються за класами чистоти.

Пакування готової продукції передбачає поміщення 10 флаконів з інструкцією по використанню у пачку по ОСТ 64-071-89 з картону коробкового за ГОСТ 7933-89 з перегородками. Перегородки мають гофровану вкладку та мають бути виготовлені згідно з ТУ У 64-23518596-001-99. На флакони клеять етикетку з інформацією. Пачки з продуктом по 50 штук вкладають в ящики. Операцію проводять на столі.

Вимоги до упаковки, маркування та транспортування продукції розписані у пункті 4.1 розділу 4.

ЗВВ 14 Знешкодження відходів та промислових викидів

Стічні води, відходи та інше сміття (наприклад, тверді, рідкі й газоподібні побічні продукти виробництва) всередині та поза будівлями, а також на безпосередньо прилеглій території слід видаляти своєчасно, забезпечуючи безпеку і дотримуючись санітарно-гігієнічних норм. Контейнери для сміття і/або стічні труби мають бути чітко ідентифіковані.

На цій стадії відбувається утилізація некондиційної продукції та посівного матеріалу, пошкодженої тари, культуральної рідини, своєчасно невикористаної сировини та напівпродуктів, відпрацьованих мийних, дезінфекційних та мийно-дезінфекційних розчинів, а також відпрацьованого технологічного аераційного та вентиляційного повітря.

Рідкі відходи, які виникли на стадіях санітарної підготовки виробництва, та не перевищують значення санітарно-гігієнічних нормативів, зливаються у загальну каналізаційну систему. У разі необхідності відходи цієї категорії підлягають нейтралізації. Їх розводять водою в 3-4 рази та вносять соляну

					ДП 6222. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		97

кислоту або гідроксид натрію доти, поки кислотність середовища не стане рівною 7,0. Оброблені таким чином відходи відводять у каналізацію.

Некондиційний посівний матеріал та культуральна рідина підлягає інактивації. Для цього проводять їх обробку гострою парою під тиском 0,3 МПа за температури 130 °С. Тривалість обробки складає 45 хв, а по її завершенню вміст реактору охолоджується водою питною через сорочку. У середину реактору вносять воду питну та соляну кислоту або гідроксид натрію для досягнення кислотності середовища рівного 7,0. Оброблені таким чином відходи відводять у каналізацію.

Повітряні викиди очищаються у циклонах від механічних включень, відділений твердий осад змішуються з стоками та подається на біологічне чищення. Очищене повітря видаляється в атмосферу або знову використовується у технологічних процесах.

Тверді відходи, серед яких некондиційна продукція та відпрацьовані матеріали, відправляються на полігон твердих побутових відходів.

ПВ 15 Переробка відходів

Відпрацьована питна вода, яка виступає тепло- і холодоносієм та не контактує з джерелом забруднення (включаючи конденсати) є умовно-чистою і може бути використана у виробничому циклі повторно. Таку воду перевіряють по показникам згідно ДСанПіН 2.2.4-171-10, а у разі виявлення порушень – відправляють на стадію водопідготовки ДР 3 або на стадію знешкодження відходів та викидів ЗВВ 14.

Відпрацьовані фільтрувальні елементи піддаються нейтралізації або утилізації. Їх очищають від забруднень, використовуючи питну воду, та обробляють дезінфектантами, при необхідності промивають водою очищеною. Відпрацьовані при цьому води та розчини відправляють на стадію ЗВВ 14.

					ДП 6222. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		98

4.4 Матеріальний баланс

Таблиця 4.2 Матеріальний баланс виробництва

Матеріальний баланс виробництва пробіотику Біоспорину розрахований на виготовлення 1 серії продукції (4895 пачок по 10 флаконів).

Використано				Отримано			
Назва сировини, матеріалів та напівпродуктів	Кількість			Назва кінцевого продукту або напівпродукту, відходів та втрат	Кількість		
	кг	шт	л		кг	шт	л
ТП 7.1 Виробниче культивування <i>B. subtilis</i>							
Кукурудзяне борошно	10,125			Культуральна рідина			142,5
Крохмаль	2,7			Втрати			7,8
Крейда	1,86						
Сульфат амонію	0,067						
Вода очищена			120,248				
Посівний матеріал			15				
Піногасник			0,3				
Всього	150,3			Всього	150,3		
ТП 7.2 Виробниче культивування <i>B. licheniformis</i>							
Кукурудзяне борошно	3,375			Культуральна рідина			47,5
Крохмаль	0,9			Втрати			2,6
Крейда	0,63						
Сульфат амонію	0,0225						
Вода очищена			40,0725				
Посівний матеріал			5				
Піногасник			0,1				
Всього	50,1			Всього	50,1		

Продовження таблиці 4.2

ТП 8 Поєднання культуральних рідин <i>B. subtilis</i> та <i>B. licheniformis</i>							
Культуральна рідина <i>B. subtilis</i>			142,5	Об'єднані культуральні рідини			184,3
Культуральна рідина <i>B. licheniformis</i>			47,5	Втрати			5,7
Всього	190			Всього	190		
ТП 9 Змішування культуральної рідини з захисним середовищем							
Об'єднані культуральні рідини			184,3	Стабілізована культуральна рідина			246
Сахароза	2,21			Втрати			4
Желатин	0,22						
Сухе знежирене молоко	5,52						
Вода очищена			57,75				
Всього	250			Всього	250		
ТП 10 Розлив рідкого напівпродукту <i>B. subtilis</i> та <i>B. licheniformis</i> у флакони							
Стабілізована культуральна рідина			246	Флакони з рідким напівпродуктом:			
Флакони		49200		флакони		49200	
				рідкий напівпродукт			234
				Втрати			12
Всього	49446	Всього	49446				

ТП 11 Сублімаційне сушіння вологого напівпродукту							
Флакони з рідким напівпродуктом:				Флакони з продуктом:			
флакони		49200		флакони		49200	
рідкий напівпродукт			234	висушений продукт	33		
				Вода			189
				Втрати			12
Всього		49434		Всього		49434	
ТП 12 Укупорювання та запаювання флаконів з висушеним продуктом							
Флакони з напівпродуктом:				Укупорені гумовими пробками та запаяні алюмінієвими кришками флакони з препаратом Біоспорин:			
флакони		49200		флакони		48950	
висушений напівпродукт	33			висушений напівпродукт	32,8		
Алюмінієві кришечки		49200		алюмінієві кришечки на флаконах		48950	
Гумові пробки		49200		гумові пробки на флаконах		48950	
				Втрати	0,2	750	
Всього		147633		Всього		147633	

ПМВ 13 Пакування, маркування та відвантаження готового продукту							
Укупорені гумовими пробками та запаяні алюмінієвими кришками флакони з препаратом Біоспорин:				Готова продукція у груповій тарі, в тому числі:			
флакони		48950		флакони		48950	
висушений напівпродукт	32,8			висушений напівпродукт	32,8		
алюмінієві кришечки на флаконах		48950		алюмінієві кришечки на флаконах		48950	
гумові пробки на флаконах		48950		гумові пробки на флаконах		48950	
Пачка з картону коробкового		4895		пачка з флаконами		4895	
Інструкції		4895		інструкції в пачці		4895	
Етикетки для флаконів		48950		етикетки на флаконах		48950	
Ящики для групової тари		979		ящики з пачками продукції		979	
Всього		206601,8		Всього		206601,8	

4.5 Контроль виробництва

Таблиця 4.3 Перелік контрольних точок

Назва стадії та номер контрольної точки	Об'єкт контролю та показник, що вивчається	Метод контролю	Періодичність перевірки	Нормативна характеристика показника
1	2	3	4	5
ДР 1.1 Підготовка персоналу К _{мб} 1.1	Руки персоналу, Мікробіологічна чистота	Засів на поживне середовище, візуально	2 рази на тиждень	Відсутність контамінації
ДР 1.2.1 Приготування розчину дегміну К _х 1.2.1.1 К _т 1.2.1.2 К _{мб} 1.2.1.3	Розчин дегміну, Концентрація дегміну	Концентратомір	Кожну операцію	1%
	Розчин дегміну, Термін зберігання	Календар		1 місяць
	Розчин дегміну, Мікробіологічна чистота	Засів на поживне середовище, візуально		Відсутність контамінації
ДР 1.2.2 Приготування розчину рецептури "С-4" К _т 1.2.2.1 К _х 1.2.2.2 К _т 1.2.2.3 К _{мб} 1.2.2.4	Розчин рецептури "С-4", Тривалість витримки	Годинник	Кожну операцію	1-1,5 год
	Розчин рецептури "С-4", Концентрація компонентів розчину рецептури "С-4"	Концентратомір		3%
	Розчин рецептури "С-4", Термін зберігання	Годинник		24 год
	Розчин рецептури "С-4", Мікробіологічна чистота	Засів на поживне середовище, візуально		Відсутність контамінації
ДР 1.2.3 Приготування розчину хлоргексидину біглюконату К _х 1.2.3.1 К _т 1.2.3.2 К _{мб} 1.2.3.3	Розчин хлоргексидину біглюконату (ХБ), Концентрація ХБ	Концентратомір	Кожну операцію	0,5%
	Розчин ХБ, Термін зберігання	Календар		1 місяць
	Розчин ХБ, Мікробіологічна чистота	Засів на поживне середовище, візуально		Відсутність контамінації

Продовження таблиці 4.3

1	2	3	4	5
ДР 1.2.4 Приготування розчину пероксиду водню К _х 1.2.4.1 К _т 1.2.4.2 К _{мб} 1.2.4.3	Розчин пероксиду водню, Концентрація пероксиду водню	Концентратомір	Кожну операцію	6%
	Розчин пероксиду водню, Термін зберігання	Календар		5 діб
	Розчин пероксиду водню, Мікробіологічна чистота	Засів на поживне середовище, візуально		Відсутність контамінації
ДР 1.2.5 Приготування мийних та мийно- дезінфікуючих розчинів К _т 1.2.5.1 К _х 1.2.5.2 К _т 1.2.5.3 К _{мб} 1.2.5.4	Розчин біомою, Температура	Термометр	Кожну операцію	40±5 °С
	Розчин біомою, Концентрація біомою	Концентратомір		0,5%
	Розчин біомою, Термін зберігання	Годинник		24 год
	Розчин біомою, Мікробіологічна чистота	Засів на поживне середовище, візуально		Відсутність контамінації
ДР 1.2.6 Підготовка розчину хлориду натрію для регенерації іонообмінної смоли К _х 1.2.6.1 К _т 1.2.6.2 К _{мб} 1.2.6.3	Розчин хлориду натрію, Концентрація хлориду натрію	Концентратомір	Кожну операцію	10%
	Розчин хлориду натрію, Температура	Термометр		40 °С
	Розчин хлориду натрію, Мікробіологічна чистота	Висів на поживне середовище, візуально		Відсутність контамінації
ДР 1.3 Підготовка виробничих приміщень К _т 1.3.1 К _{мб} 1.3.2	Допустиме запилення у приміщеннях класів <i>D</i> , <i>C</i> , <i>B</i> та зоні класу <i>A</i> у функціонуючому стані; Частинки розміром 5 мкм та 0,5 мкм	Портативні лічильники часток	Кожну операцію	<i>D</i> : не нормується <i>C</i> : n = 29000 та 3520000 <i>B</i> : n = 2900 та 352000 <i>A</i> : n = 20 та 3520
	Допустима мікробіологічна контамінація у приміщеннях класів <i>D</i> , <i>C</i> , <i>B</i> та у зоні класу <i>A</i> у функціонуючому стані	Змиви з поверхонь		<i>D</i> : 200 КУО/м ³ <i>C</i> : 100 КУО/м ³ <i>B</i> : 10 КУО/м ³ <i>A</i> : < 1 КУО/м ³

Продовження таблиці 4.3

1	2	3	4	5
ДР 1.4.1 Миття та дезінфекція обладнання К _Т 1.4.1.1 К _Т 1.4.1.2 К _Х 1.4.1.3 К _Т 1.4.1.4	Параметри розчинів для миття та дезінфекції, Температура	Термометр	Протягом процесу	60 °С
	Розчин для регенерації іонообмінної смоли, Температура	Термометр	Протягом процесу	40 °С
	Водний витяг вугілля, Вміст хлору та кислотність	Титрування	Щоквартально	≤ 0,003% рН 4,5–5,0
	Регенерація вугілля, Температура	Термометр	Протягом процесу	800-900 °С
ДР 1.4.2 Перевірка обладнання на герметичність К _Т 1.4.2.1 К _Т 1.4.2.2	Режим перевірки, Тиск	Манометр, мильна вода	Протягом процесу	0,5 МПа; 0,3 МПа
	Режим перевірки, Тривалість	Годинник	Протягом процесу	30 хв
ДР 1.4.3 Стерилізація обладнання К _Т 1.4.3.1 К _Т 1.4.3.2 К _Т 1.4.3.3 К _Т 1.4.3.4 К _{мб} 1.4.3.5	Параметри стерилізації ємнісного обладнання та комунікацій	Термометр	Протягом процесу	120-126 °С
		Годинник		1 год
		Манометр		0,3 МПа
	Параметри стерилізації апаратури й комунікації для подачі піногасника	Термометр	Протягом процесу	125-135 °С
		Годинник		1,5-2 год
		Манометр		0,3 МПа
	Параметри стерилізації повітряних фільтрів і комунікацій	Термометр	Протягом процесу	110 °С
		Годинник		2 год
		Манометр		0,4 МПа
	Параметри стерилізації фільтру фінішної очистки	Годинник	Протягом процесу	240 хв
		Термометр		35 °С
		Манометр		0,65 МПа
	Простерилізовані апарати, Мікробіологічна чистота	Засів на поживне середовище, візуально	Кожну операцію	Відсутність контамінації

Продовження таблиці 4.3

1	2	3	4	5
ДР. 2.1.2 Попередня очистка повітря К _Т 2.1.2.1	Повітря, Перепад тиску	Манометр	Протягом процесу	Стале задане значення
ДР. 2.1.3 Транспортування повітря К _Т 2.1.3.1 К _Т 2.1.3.2	Повітря, Тиск	Манометр	Протягом процесу	0,2 МПа
	Повітря, Температура	Термометр		120 °С
ДР 2.1.4 Кондиціонування повітря К _Т 2.1.4.1	Повітря, Температура	Термометр	Протягом процесу	18-20 °С
ДР 2.1.5 Тонка очистка повітря К _Т 2.1.5.1	Повітря, Перепад тиску	Манометр	Протягом процесу	Стале задане значення
ДР 2.1.6 Високоєфективна очистка повітря К _Т 2.1.6.1 К _Т 2.1.6.2 К _Т 2.1.6.3	Повітря, Перепад тиску	Манометр	Протягом процесу	Стале задане значення
	Повітря, Вологість	Психрометр		45±5%
	Повітря, Температура	Термометр		20±2°С
ДР 2.2.2 Попереднє очищення повітря та його стиснення К _Т 2.2.2.1 К _Т 2.2.2.2 К _Т 2.2.2.3	Повітря, Перепад тиску	Манометр	Протягом процесу	Стале задане значення
	Повітря, Температура	Термометр		150 °С
	Повітря, Тиск	Манометр		0,3 МПа
ДР 2.2.3 Охолодження повітря та згладжування коливань витрат К _Т 2.2.3.1 К _Т 2.2.3.2 К _Т 2.2.3.3	Повітря, Температура	Термометр	Протягом процесу	37 °С
	Повітря, Вологість	Психрометр		60%
	Повітря, Тиск	Манометр		0,3 МПа
ДР 2.2.4 Очищення повітря на головному фільтрі К _Т 2.2.4.1	Повітря, Перепад тиску	Манометр	Протягом процесу	Стале задане значення

Продовження таблиці 4.3

1	2	3	4	5
ДР 2.2.5 Тонке очищення повітря К _Т 2.2.5.1 К _Т 2.2.5.2	Повітря, Перепад тиску	Манометр	Протягом процесу	Стале задане значення
	Повітря, Температура	Термометр		37 °С
ДР 3.1 Підігрів і термостатування К _Т 3.1.1	Вода у теплообміннику, Температура	Термометр	Протягом процесу	20 °С
ДР 3.2 Грубе очищення води К _Т 3.2.1	Вода у трубопроводі, Тиск	Манометр	Протягом процесу	0,6±0,01 МПа
ДР 3.3 Пом'якшення води на іонообмінній смолі К _Т 3.3.1	Вода пом'якшена, Жорсткість води	TDS-метр	Кожну операцію	<0,01 мг-екв/л
ДР 3.4 Фільтрація води пом'якшеної вугільний фільтр К _Т 3.4.1	Вода у трубопроводі, Тиск	Манометр	Протягом процесу	0,6 МПа
ДР 3.5 Очищення води у системі зворотнього осмосу К _Х 3.5.1 К _Х 3.5.2 К _Х 3.5.3 К _Т 3.5.4 К _Т 3.5.5	Вода очищена, Загальний органічний вуглець	Хімічний метод визначення концентрації	Кожну операцію	≤0,5 мг/л
	Вода очищена, Нітрати			≤0,00002 %
	Вода очищена, Важкі метали			≤0,00001 %
	Вода очищена, Витрата води	Витратомір	Протягом процесу	Стале задане значення
	Вода очищена, Питома електропровідність	Кондуктометр	Кожну операцію	4,3 μS/cm

Продовження таблиці 4.3

1	2	3	4	5
ДР 3.6 Надходження води очищеної у збірник К _Т 3.6.1 К _Т 3.6.2 К _Т 3.6.3 К _Т 3.6.4 К _Т 3.6.5 К _{мб} 3.6.6	Бактерицидні УФ-лампи, Довжина хвилі	УФ-радіометр	Протягом процесу	185 нм, 245 нм, 254 нм
	Вода очищена, Температура	Термоперетворювач		20 °С
	Вода очищена, Рівень води	Поплавковий датчик		Відповідно конструкції
	Вода очищена у трубопроводі, Тиск	Манометр		0,6 МПа
	Вода очищена, Витрата води	Витратомір		Стале задане значення
	Вода очищена, Кількість живих аеробних КУО в 1 мл	Мембранна фільтрація та висів на поживне середовище	Кожну операцію	<100
ДР 4.1.1 Приготування та стерилізація розчину 1 К _Т 4.1.1.1 К _Т 4.1.1.2 К _Т 4.1.1.3 К _Т 4.1.1.4	Режим стерилізації, Температура	Термометр	Протягом процесу	112 °С
	Режим стерилізації, Тривалість	Годинник		30 хв
	Режим стерилізації, Тиск	Манометр		0,11 МПа
	Компоненти середовища, Вага компонентів	Електронні ваги	Кожну операцію	m _{комп.}
ДР 4.1.2 Приготування та стерилізація розчину 2 К _Т 4.1.2.1 К _Т 4.1.2.2 К _Т 4.1.2.3 К _Т 4.1.2.4	Режим стерилізації, Температура	Термометр	Протягом процесу	121±1 °С
	Режим стерилізації, Тривалість	Годинник		25 хв
	Режим стерилізації, Тиск	Манометр		0,1 МПа
	Компоненти середовища, Вага компонентів	Електронні ваги	Кожну операцію	m _{комп.}
ДР 4.1.3 Об'єднання простерилізованих розчинів К _{мб} 4.1.3.1	Стерильне середовище, Мікробіологічна чистота	Висів на поживне середовище, візуально	Кожну операцію	Відсутність росту

Продовження таблиці 4.3

1	2	3	4	5
ДР 4.2.1 Приготування та стерилізація розчинів 1 К _Т 4.2.1.1 К _Т 4.2.1.2 К _Т 4.2.1.3 К _Т 4.2.1.4 К _Т 4.2.1.5 К _Т 4.2.1.6 К _Т 4.2.1.7	Режим перемішування, К-ть обертів валу мішалки	Тахометр	Протягом процесу	50-60 об/хв
	Вода очищена, Температура	Термометр	Кожну операцію	30 °С
	Режим стерилізації, Температура	Термометр	Протягом процесу	112 °С
	Режим стерилізації, Тривалість	Годинник		30 хв
	Режим стерилізації, Тиск	Манометр		0,15 МПа
	Вода питна, Температура	Термометр	Кожну операцію	37 °С
	Компоненти середовища, Кількість компонентів	Дозатор		m _{комп.}
ДР 4.2.2 Приготування та стерилізація розчинів 2 К _Т 4.2.2.1 К _Т 4.2.2.2 К _Т 4.2.2.3 К _Т 4.2.2.4 К _Т 4.2.2.5 К _Т 4.2.2.6	Режим стерилізації, Температура	Термометр	Протягом процесу	131 °С
	Режим стерилізації, Тривалість	Годинник		60 хв
	Режим стерилізації, Тиск	Манометр		0,1 МПа
	Вода питна, Температура	Термометр	Кожну операцію	37 °С
	Режим перемішування, К-ть обертів валу мішалки	Тахометр	Протягом процесу	30-40 об/хв
	Компоненти середовища, Кількість компонентів	Дозатор	Кожну операцію	m _{комп.}
ДР 4.2.3 Внесення розчинів у посівні апарати та у ферментери К _{МБ} 4.2.3.1 К _Т 4.2.3.2	Стерильне середовище, Мікробіологічна чистота	Висів на поживне середовище, візуально	Кожну операцію	Відсутність росту
	Режим перемішування, К-ть обертів валу мішалки	Тахометр	Протягом процесу	30-40 об/хв

Продовження таблиці 4.3

1	2	3	4	5
ДР 4.3.1 Приготування та стерилізація розчину сахарози К _т 4.3.1.1 К _т 4.3.1.2 К _т 4.3.1.3 К _т 4.3.1.4 К _т 4.3.1.5 К _т 4.3.1.6 К _т 4.3.1.7	Режим перемішування, К-ть обертів валу мішалки	Тахометр	Протягом процесу	30-40 об/хв
	Режим стерилізації, Температура	Термометр		100 °С
	Режим стерилізації, Тривалість	Годинник		60 хв
	Режим стерилізації, Тиск	Манометр		0,05 МПа
	Вода питна, Температура	Термометр	Кожну операцію	30 °С
	Вода очищена, Температура	Термометр		60-80 °С
	Компоненти середовища, Кількість компонентів	Дозатор		m _{комп.}
ДР 4.3.2 Приготування та стерилізація розчину желатину К _т 4.3.2.1 К _т 4.3.2.2 К _т 4.3.2.3 К _т 4.3.2.4 К _т 4.3.2.5 К _т 4.3.2.6 К _т 4.3.2.7	Режим перемішування К-ть обертів валу мішалки	Тахометр	Протягом процесу	30-40 об/хв
	Режим стерилізації, Температура	Термометр		100 °С
	Режим стерилізації, Тривалість	Годинник		60 хв
	Режим стерилізації, Тиск	Манометр		0,05 МПа
	Вода питна, Температура	Термометр	Кожну операцію	30 °С
	Вода очищена, Температура	Термометр		50-60 °С
	Компоненти середовища, Кількість компонентів	Дозатор		m _{комп.}
ДР 4.3.3 Приготування та стерилізація розчину знежиреного молока К _т 4.3.3.1 К _т 4.3.3.2 К _т 4.3.3.3 К _т 4.3.3.4 К _т 4.3.3.5 К _т 4.3.3.6 К _т 4.3.3.7	Режим перемішування К-ть обертів валу мішалки	Тахометр	Протягом процесу	30-40 об/хв
	Режим стерилізації, Температура	Термометр		120-122 °С
	Режим стерилізації, Тривалість	Годинник		60 хв
	Режим стерилізації, Тиск	Манометр		0,05 МПа
	Вода питна, Температура	Термометр	Кожну операцію	30 °С
	Вода очищена, Температура	Термометр		65-75 °С
	Компоненти середовища, Кількість компонентів	Дозатор		m _{комп.}

Продовження таблиці 4.3

1	2	3	4	5
ДР 4.4 Підготовка та стерилізація піногасника К _Т 4.4.1 К _Т 4.4.2 К _Т 4.4.3 К _Т 4.4.4 К _{мб} 4.4.5	Режим стерилізації, Тривалість	Годинник	Протягом процесу	120 хв
	Режим стерилізації, Тиск	Манометр		0,1 МПа
	Режим стерилізації, Температура	Термометр		120-122 °С
	Піногасник, Температура	Термометр		37 °С
	Стерильний піногасник Мікробіологічна чистота	Засів на поживне середовище, візуально	Кожну операцію	Відсутність росту
ДР 4.5 Підготовка допоміжних розчинів К _х 4.5.1 К _Т 4.5.2 К _Т 4.5.3 К _Т 4.5.4 К _Т 4.5.5 К _{мб} 4.5.6	Допоміжні розчини, Концентрація	Концентратомір	Кожну операцію	С(НCl) = 6% С(NaOH) = 10%
	Режим стерилізації, Тривалість	Годинник	Протягом процесу	120 хв
	Режим стерилізації, Тиск	Манометр		0,1 МПа
	Режим стерилізації, Температура	Термометр		120-122 °С
	Розчини, Температура	Термометр		37 °С
	Стерильні розчини Мікробіологічна чистота	Засів на поживне середовище, візуально	Кожну операцію	Відсутність росту
ДР 5 Підготовка флаконів і закупорювальних засобів К _Т 5.1 К _Т 5.2 К _Т 5.3	Первинна тара Цілісність, чистота	Візуально	Кожну операцію	Кондиційний стан
	Режим стерилізації, Температура	Термометр	Протягом процесу	315±35 °С
	Режим стерилізації, Тривалість	Годинник		15-30 хв

Продовження таблиці 4.3

1	2	3	4	5
ТП 6.1 Відновлення ліофілізованої культури <i>B.</i> <i>subtilis</i> К _т 6.1.1 К _т 6.1.2 К _{мб} 6.1.3	Режим культивування, Температура	Термометр, Термостатич- ний прибор	Протягом процесу	37 °С
	Режим культивування, Тривалість	Годинник		20 год
	Культуральна рідина, Мікробіологічна чистота культури	Засів на поживне середовище, мікроскопія	Кожну операцію	Відсутність сторонньої мікрофлори
ТП 6.2 Вирощування посівного матеріалу <i>B.</i> <i>subtilis</i> в колбах на качалках К _т 6.2.1 К _т 6.2.2 К _т 6.2.3 К _х 6.2.4 К _{мб} 6.2.5	Режим культивування, Температура	Термометр	Протягом процесу	37 °С
	Режим культивування, Тривалість	Годинник		16-24 год
	Режим культивування, Оберти качалок	Тахометр		200-220 об/хв
	Культуральна рідина, Кислотність	pH-метр	Кожну операцію	7,2-7,6
	Культуральна рідина, Мікробіологічна чистота культури, кількість КУО в 1 см ³	Засів на поживне середовище, візуально, мікроскопія		Відсутність сторонньої мікрофлори, КУО ≥ 1010
ТП 6.3 Вирощування посівного матеріалу <i>B.</i> <i>subtilis</i> в посівному апараті К _т 6.3.1 К _т 6.3.2 К _т 6.3.3 К _т 6.3.4 К _т 6.3.5 К _{мб} 6.3.6	Режим культивування, Температура	Термометр	Протягом процесу	37±1 °С
	Режим культивування, Тривалість	Годинник		24 год
	Режим культивування, Оберти мішалки	Тахометр		500 об/хв
	Режим культивування, К-ть повітря на 1 м ³ за 1 хв	Модуль аерації		0,7 м ³
	Режим культивування, Тиск	Манометр	Кожну операцію	0,1±0,05 МПа
	Культуральна рідина, Мікробіологічна чистота культури	Засів на поживне середовище, візуально		Відсутність контамінації сторонньою мікрофлорою

Продовження таблиці 4.3

1	2	3	4	5
ТП 6.3 (продовження) К _{мб} 6.3.7 К _{мб} 6.3.8 К _х 6.3.9	Культуральна рідина, % спор від КУО	Мікроскопіювання	Кожну операцію	50%
	Культуральна рідина, Кількість КУО в 1 см ³	Спектрофотометр		КУО ≥1010
	Культуральна рідина, Кислотність	pH-метр	Кожну операцію	7,2-7,6
ТП 6.4 Відновлення ліофілізованої культури <i>B. licheniformis</i> К _т 6.4.1 К _т 6.4.2 К _{мб} 6.4.3	Режим культивування, Температура	Термометр, Термостатичний прибор	Протягом процесу	37 °С
	Режим культивування, Тривалість	Годинник		20 год
	Культуральна рідина, Мікробіологічна чистота культури	Засів на поживне середовище, візуально	Кожну операцію	Відсутність контамінації сторонньою мікрофлорою
ТП 6.5 Вирощування посівного матеріалу <i>B. licheniformis</i> в колбах на качалках К _т 6.5.1 К _т 6.5.2 К _т 6.5.3 К _х 6.5.4 К _{мб} 6.5.5	Режим культивування, Температура	Термометр	Протягом процесу	37 °С
	Режим культивування, Тривалість	Годинник		16-24 год
	Режим культивування, Оберти качалок	Тахометр		200-220 об/хв
	Культуральна рідина, Кислотність	pH-метр	Кожну операцію	8,0-8,5
	Культуральна рідина, Мікробіологічна чистота культури, кількість КУО в 1 см ³	Висів на поживне середовище, візуально		Відсутність контамінації сторонньою мікрофлорою, КУО ≥1010

Продовження таблиці 4.3

1	2	3	4	5
ТП 6.6 Вирощування посівного матеріалу <i>B. licheniformis</i> в посівному апараті К _т 6.6.1 К _т 6.6.2 К _т 6.6.3 К _т 6.6.4 К _т 6.6.5 К _{мб} 6.6.6 К _{мб} 6.6.7 К _{мб} 6.6.8 К _х 6.6.9	Режим культивування, Температура	Термометр	Протягом процесу	37±1 °С
	Режим культивування, Тривалість	Годинник		28 год
	Режим культивування, Оберти мішалки	Тахометр		320 об/хв
	Режим культивування, К-ть повітря на 1 м ³ за 1 хв	Модуль аерації		0,4 м ³
	Режим культивування, Тиск	Манометр		0,1±0,05 МПа
	Культуральна рідина, Мікробіологічна чистота культури	Висів на поживне середовище, візуально	Кожну операцію	Відсутність контамінації сторонньою мікрофлорою
	Культуральна рідина, Кількість КУО в 1 см ³	Спектрофото- метр		КУО ≥1010
	Культуральна рідина, % спор від КУО	Мікроскопію- вання		50%
	Культуральна рідина, Кислотність	pH-метр	Кожну операцію	8,0-8,5
ТП 7.1 Культивування <i>B. subtilis</i> у виробничому ферментері К _т 7.1.1 К _т 7.1.2 К _т 7.1.3 К _т 7.1.4 К _т 7.1.5 К _{мб} 7.1.6 К _{мб} 7.1.7 К _{мб} 7.1.8 К _х 7.1.9	Режим культивування, Температура	Термометр	Протягом процесу	37±1 °С
	Режим культивування, Тривалість	Годинник		26-36 год
	Режим культивування, Оберти мішалки	Тахометр		500 об/хв
	Режим культивування, К-ть повітря на 1 м ³ за 1 хв	Модуль аерації		0,7 м ³
	Режим культивування, Тиск	Манометр		0,1±0,05 МПа
	Культуральна рідина, Мікробіологічна чистота культури	Висів на поживне середовище, візуально	Кожну операцію	Відсутність контамінації сторонньою мікрофлорою
	Культуральна рідина, Кількість КУО в 1 см ³	Спектрофото- метр		КУО ≥ 1,101×10 ⁹
	Культуральна рідина, % спор від КУО	Мікроскопію- вання		50%
	Культуральна рідина, Кислотність	pH-метр		7,2-7,6

Продовження таблиці 4.3

1	2	3	4	5
ТП 7.2 Культивування <i>B. licheniformis</i> у виробничому ферментері К _Т 7.2.1 К _Т 7.2.2 К _Т 7.2.3 К _Т 7.2.4 К _Т 7.2.5 К _{МБ} 7.2.6 К _{МБ} 7.2.7 К _{МБ} 7.2.8 К _Х 7.2.9	Режим культивування, Температура	Термометр	Протягом процесу	37±1 °С
	Режим культивування, Тривалість	Годинник		26-36 год
	Режим культивування, Оберти мішалки	Тахометр		320 об/хв
	Режим культивування, К-ть повітря на 1 м ³ за 1 хв	Модуль аерації		0,4 м ³
	Режим культивування, Тиск	Манометр		0,1±0,05 МПа
	Культуральна рідина, Мікробіологічна чистота	Висів на поживне середовище, візуально	Кожну операцію	Відсутність контамінації сторонньою мікрофлорою
	Культуральна рідина, Кількість КУО в 1 см ³	Спектрофото- метр		КУО ≥ 0,367×10 ⁹
	Культуральна рідина, % спор від КУО	Мікроскопію- вання		50%
	Культуральна рідина, Кислотність	pH-метр		8,0-8,5
ТП 8 Поєднання культуральних рідин <i>B.</i> <i>subtilis</i> та <i>B.</i> <i>licheniformis</i> К _{МБ} 8.1 К _Т 8.2	Культуральні рідини, Співвідношення	Мікроскопію- вання	Кожну операцію	3:1
	Об'єднані культуральні рідини, Температура	Термометр	Протягом процесу	8 °С
ТП 9 Змішування культуральної рідини з захисним середовищем К _Т 9.1 К _Т 9.2 К _Т 9.3 К _{МБ} 9.4	Режим гомогенізації, Тривалість	Годинник	Протягом процесу	20-25 хв
	Режим гомогенізації, Оберти мішалки	Тахометр		1000 об/хв
	Режим гомогенізації, Температура	Термометр		8 °С
	Напівпродукт, Мікробіологічна чистота	Мікроскопію- вання	Кожну операцію	Відсутність контамінації сторонньою мікрофлорою

Продовження таблиці 4.3

1	2	3	4	5
ТП 10 Розлив рідкого напівпродукту <i>B. subtilis</i> та <i>B. licheniformis</i> К _т 10.1 К _т 10.2	Рідкий напівпродукт, Об'єм у флаконі	Автоматично	Кожну операцію	4,0 см ³
	Режим перемішування, Оберти мішалки	Тахометр	Протягом процесу	1000 об/хв
ТП 11.1 Заморожування напівпродукту К _т 11.1.1 К _т 11.1.2	Режим заморозки, Температура	Термометр	Протягом процесу	-40 °C
	Режим заморозки, Тривалість	Годинник		24 год
ТП 11.2 Сублімаційне сушіння напівпродукту К _т 11.2.1 К _т 11.2.2 К _т 11.2.3 К _т 11.2.4 К _т 11.2.5	Режим сушіння, Температура	Термометр	Протягом процесу	34 °C
	Режим сушіння, Тиск	Манометр		26 Па
	Режим сушіння, Тривалість	Годинник		36 год
	Режим сушіння, Оберти барабану	Тахометр		300 об/хв
	Висушений напівпродукт Вологість	Ваги, висушування до постійної маси	Кожну операцію	3-4%
ТП 12 Укупорювання флаконів з висушеним продуктом К _т 12.1 К _т 12.2	Флакони, Цілісність тари	Візуально	Кожну операцію	Кондиційний стан
	Алюмінієві кришечки, Якість обтиснення			Щільно прилягають, гофри відсутні
ПМВ 13 Пакування, маркування та відвантаження готового продукту К _т 13.1 К _т 13.2 К _т 13.3	Продукт, Кількість флаконів у коробці	Візуально	Кожну операцію	По 10 флаконів у коробці
	Продукт, Маркування			Відповідно до НТД
	Продукт, Температура зберігання	Термометр	Протягом процесу	≤ 25 °C

Продовження таблиці 4.3

1	2	3	4	5
ЗВВ 14 Знешкодження відходів та промислових викидів К _т 14.1 К _х 14.2 К _{мб} 14.3	Відпрацьовані речовини та матеріали, Концентрація відходів	Кількісний хімічний та мікробіологічний аналіз	Кожну операцію	Відповідно до ДСанПіН
ПВ 15 Переробка відходів К _т 15.1 К _х 15.2 К _{мб} 15.3	Відпрацьовані речовини та матеріали Наявність забруднень	Кількісний хімічний та мікробіологічний аналіз	Кожну операцію	Відповідно до нормативної документації

4.6 Технологічна схема виробництва

Технологічна схема виробництва пробіотику Біоспорин подана на двох аркушах формату А1 у графічній частині дипломного проекту.

РОЗДІЛ 5. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ

5.1 Обґрунтування вибраної конструкції. Підбір конструкційних матеріалів для окремих елементів апарату

Сублімаційні сушарки використовуються для сушіння біомаси у замороженому стані в умовах вакууму. Основна кількість вологи (75-90%) видалається при сублімації льоду при температурі продукту нижче 0 °С, і лише видалення залишкової вологи відбувається при нагріванні матеріалу до 30-60°С. При сублімаційному висушуванні відсутня окислювальна дія кисню повітря, в результаті чого висушена біомаса відрізняється високою якістю та зберігає свої властивості. З точки зору зберігання якості сублімаційна сушка є найбільш досконалою з усіх способів сушіння [61].

Сублімаційний (ліофільний) метод висушування ґрунтується на вилученні вологи з матеріалу, який знаходиться у замороженому стані. При цьому лід переходить в газовий стан, обминаючи рідкий.

Більшу частину часу сушіння матеріал знаходиться при температурі мінус 15 °С – мінус 30°С. Оскільки процес ведуть при дуже низьких тисках (50÷150 Па), то на матеріал не діє не тільки тепло, але й кисень повітря.

Заморожування вологого неживого матеріалу не викликає труднощів, але вони виникають при заморожуванні живої біомаси, властивості якої повинні відновитись після надходження висушеної біомаси в нормальне середовище. Якщо занадто швидко заморожувати живу біомасу без вживання запобіжних заходів, то кристалики льоду будуть пошкоджувати біологічні мембрани, що призведе до загибелі клітин. Для попередження цього явища перед сушінням біомасу змішують з кріопротектором, що запобігає

					ДП 6222. 00.000 ПЗ		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розробив		Юрченко Е.В.			РОЗДІЛ 5. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ	Стадія	Аркуш
Консульт.		Фесенко С.В.				Д	118
						Аркушів	
						144	
Керівник		Ялабенко О. І.				КПІ ім. Ігоря Сікорського	
Затвер.						ФБТ	

утворенню кристалів з гострими краями. Занадто повільне охолодження та занадто повне висушування також можуть призвести до загибелі живих клітин [62].

Обрана для сублімаційного висушування конструкція дозволяє проводити етап заморожування безпосередньо в сублімаційній шафі. Заморожування біоматеріалу безпосередньо на полицях сучасних субліматорів значно спрощує процес отримання сухого продукту та знижує вірогідність контамінації в процесі перенесення напівпродукту між апаратами [63].

До субліматорів періодичної дії належать апарати для сушіння безпосередньо у флаконах або ампулах шкафного типу [62]. Така установка являє собою горизонтальний циліндричний апарат зі з'ємною кришкою, встановленою на поворотному кронштейні. Кришка кріпиться до корпусу апарату спеціальними затискачами або відкидними бовтами. На корпусі і кришці шкафу наявні оглядові вікна. В середині апарату на чотирьох стінках встановлені нагрівальні плити, зварені з двох листових пластин з вставленими між ними перегородками. Ці перегородки направляють рух теплоносія, забезпечуючи рівномірний нагрів всієї поверхні плити. В кожній плиті наявні по два штуцери, що об'єднані в колектори входу пари і виходу конденсату. Касети з біомасою у флаконах, загрузають в касети, які встановлюють на всі нагрівальні плити, крім останньої, оскільки на неї падають краплі вологи, що конденсуються на стінках шафи. Окремі краплі вологи, що сконденсувалися на бокових стінках шафи, стікають вниз, а після завершення процесу відводяться через зливний штуцер. Сушка протікає під дією кондуктивного нагріву нерухомого шару матеріалу в умовах вакууму. Пари вологи, що випарюються в процесі сушіння, і повітря відкачуються з шафи вакуум-насосом [64].

Враховуючи високу вологість в апараті в період роботи обрана вакуум-сублімаційна сушильна шафа виготовляється з неіржавіючої сталі Х18Н10Т.

					ДП 6222. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		119

Метод сушки сублімацією дозволяє зберегти основні біологічні якості біомаси, а також висушений таким чином матеріал може зберігатися тривалий час. Проте, необхідно забезпечити герметичність продукту, оскільки отриманий порошок володіє гарними сорбційними властивостями, що може спричинити адсорбцію води та його окиснення киснем повітря, що призведе до зниження якості отриманої продукції [63].

У виробництві обрана саме сублімаційна сушарка, оскільки, незважаючи на порівняно високу вартість, вона має вагомі переваги в порівнянні з конструкціями інших типів. Інфрачервоні сушарки потребують високих витрат електроенергії, причому висушуваний матеріал прогрівається нерівномірно, а часточки злипаються між собою, необхідне “ручне” перемішування продукту, що неможливо зробити у флаконах. Конвективні сушарки працюють за принципом продувки матеріалу підігрітим повітрям, що може пошкодити клітини та спричинити значні втрати [65].

На рис. 5.1 наведена принципову схему вакуум-сублімаційної установки періодичної дії.

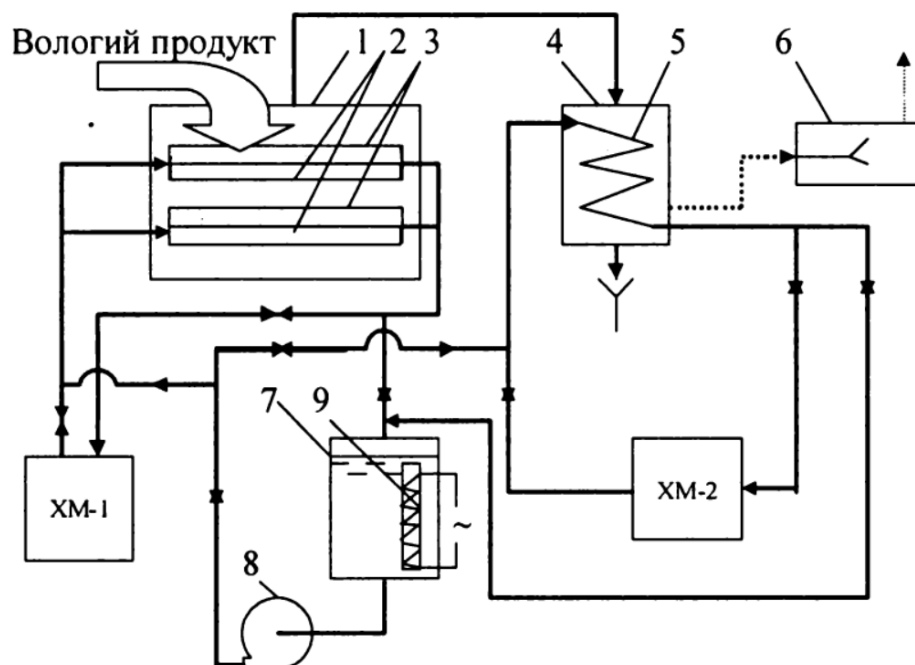


Рис. 5.1 Принципова схема вакуум-сублімаційної установки періодичної дії (пояснення в тексті)

У сублімаційній камері 1 розташовуються плити 2, на які встановлюються касети з флаконами 3, в які налита суспензія, що підлягає сушінню.

Камеру герметизують, вмикають холодильну машину ХМ-1, яка прокачує холодоносій крізь плити 2. Суспензія замерзає, перетворюючись на лід у флаконі. Розсіл від холодильної машини спрямовують у змійовик, занурений в рідину в ємності 7 (на схемі лінії сполучення і змійовик не показано) з метою охолодження цього розсолу до потрібної температури, яка вище температури сублімації. Сублімаційну камеру з'єднують з конденсатором 4, в якому розташований змійовик або інший теплообмінний пристрій з розвиненою поверхнею 5. Від холодильної машини ХМ-2 у змійовик починають подавати розсіл з температурою нижче, ніж температура замороженого матеріалу (температури сублімації). Вмикають вакуум-насос 6 і створюють глибокий вакуум у конденсаторі і сублімаційній камері (15-150 Па).

Розсіл в ємності 7 насосом 8 починають прокачувати крізь плити. Оскільки температура розсолу вище за температуру замороженого матеріалу, до матеріалу надходить тепло, яке необхідне для сублімації льоду; температура льоду при цьому не змінюється. Охолоджений розсіл повертається у ємність 7, де його підігрівають трубчастими електронагрівачами 9. Водяна пара з субліматора надходить у конденсатор 4.

Оскільки температура в конденсаторі нижче температури в субліматорі, то водяна пара утворює на поверхні теплообмінного пристрою 5 шар льоду. Після закінчення процесу сушіння температуру розсолу, що циркулює через ємність 7, піднімають і доводять температуру висушеного матеріалу до нормальної або дещо вище. Вимикають вакуум-насос, холодильну машину ХМ-2. Апаратуру повністю з'єднують з атмосферою через змійовик 5 за допомогою насоса 8 прокачують теплий розсіл і розморожують шар льоду на поверхні змійовика 5. Воду з конденсатора зливають в каналізацію. Із

					ДП 6222. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		121

сублімаційної камери вивантажують висушений матеріал, установку готують до наступного технологічного циклу [62].

5.2 Розрахунок сублімаційної сушарки періодичної дії

Вихідні дані для розрахунку:

Об'єм напівпродукту, що підлягає сушінню за технологічний цикл:	234 л
Потужність установки	$33 \frac{\text{кг}}{\text{цикл}}$
Тривалість технологічного циклу:	
тривалість заморожування	24 год;
тривалість висушування	36 год.
Температура технологічного процесу:	
температура заморожування	– 40 °С;
температура наприкінці сушіння	34 °С.
Початкова температура напівпродукту	8 °С
Питома теплоємність напівпродукту	$3,1 \frac{\text{кДж}}{\text{кг} \cdot \text{К}}$
Коефіцієнт масопередачі	$5 \cdot 10^{-5} \text{ с/м}$

5.2.1 Розрахунок основних розмірів сублімаційної камери

За технологічний цикл сублімації необхідно переробити 234 л біомаси, яка попередньо була розлита у флакони по 5 см³. Для вмісту такої кількості біомаси необхідно 49200 флаконів. Зовнішній діаметр одного флакону становить 0,016 м. Враховуючи, що доля зайнятої флаконами поверхні становить 0,9069 розрахуємо необхідну площу поверхні касет:

$$S_{\text{п.п.}} = 0,9069n \times d^2 = 0,9069 \times 49200 \times 0,016^2 = 11,42 \text{ м}^2. \quad (5.1)$$

На рис. 5.2 показано поперечний переріз камери.



Рис. 5.2 Поперечний переріз камери

Висота флакону становить 51 мм, тому загальна висота касет з флаконами і плити разом з повітряним зазором між ними (0,5 мм) дорівнює 91 мм. Враховуючи паровий простір між сусідніми плитою і касетою з флаконами, який дорівнює 9 мм, висота системи “плита-касета” дорівнює 100 мм.

Позначимо кількість касет n . Тоді висота пакета касет становить $0,1n$ м.

Найбільш компактне розташування касет – куб, тобто висота пакету повинна дорівнювати ширині (Ш) і довжині (Д) касет:

$$\text{Ш} \times \text{Д} \times n = 11,42 \text{ м}^2, \text{ тобто } 0,1n \times 0,1n \times n = 11,42 \text{ м}^2.$$

Звідси, $n \approx 10$. Враховуючи, що на верхню касету буде крапати сконденсована волога, необхідним є встановлення 11 касет.

Отже, ширина (і довжина) касет становить $0,1 \times 11 = 1,1$ м. Таким чином, поверхня однієї касети становить $1,1 \times 1,1 = 1,21 \text{ м}^2$, а загальна площа – $1,21 \times 11 = 13,31 \text{ м}^2$.

Діаметр кола, яке описане навколо квадрата зі стороною 1,1 м, становить:

$$D = \sqrt{(1,1)^2 + (1,1)^2} = 1,556 \text{ м.} \quad (5.2)$$

З урахуванням запасу на конструктивні деталі внутрішній діаметр сублімаційної камери можна прийняти 1,6 м, а її довжину – 1,2 м [62].

5.2.2 Розрахунок маси сублімаційної камери

Товщину стінок сублімаційної камери розрахуємо за формулою:

$$\delta = 0,47 \frac{D}{100} \left(\frac{p}{10^{-6} \times E} \times \frac{l}{D} \right)^{0,4} + C + C_i, \quad (5.3)$$

де δ – товщина стінки, м;

p – розрахунковий тиск, МПа

В цих розрахунках зовнішній тиск дорівнює 0,101325 МПа, а з коефіцієнтом запасу міцності 1,5 $p = 0,101325 \times 1,5 = 0,152$ МПа.

D – внутрішній діаметр апарата, м (1,1 м);

l – довжина обичайки (1,2 м);

E – модуль повздовжньої пружності ($1,99 \times 10^5$, МПа);

C – додаток до розрахункової товщини для компенсації корозії, м;

$C = P\tau_a$, де P – корозійна проникливість м/рік ($P = 10^{-4}$ м/рік), τ_a – амортизаційний термін служби апарату, років (прийmemo 10 років);

C_i – додаток на заокруглення до цілого числа міліметрів [62].

Отже,

$$\delta = 0,47 \frac{1,6}{100} \left(\frac{0,152}{10^{-6} \times 1,99 \times 10^5} \times \frac{1,2}{1,6} \right)^{0,4} + 10^{-4} \times 10 + 0,0005562 = 0,008 \text{ м},$$

$$\delta = 8 \text{ мм.}$$

Поверхня обичайки камери дорівнює:

$$F_{об} = 3,14 \left(\frac{1,6 + 1,86}{2} \right) \times 1,2 = 6,52 \text{ м}^2. \quad (5.4)$$

Об'єм металу, який пішов на виготовлення обичайки:

$$V_{м.об.} = 6,52 \times 0,0076 = 0,05 \text{ м}^3. \quad (5.5)$$

Товщину еліптичних кришок розраховуємо за формулами:

$$\delta = \frac{k_e \times R}{300} \sqrt{\frac{p}{10^{-6} \times E}} + C + C_1, \quad (5.5)$$

$$\delta = \frac{p \times R}{2\sigma_{доп}} \beta_1 + C + C_1. \quad (5.6)$$

					ДП 6222. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		124

де, R – радіус кривизни у вершині еліптичного днища (3м);

k_e – коефіцієнт, який залежить від відношення висоти кришки до діаметра кришки (приблизно 0,3) і відношення радіуса кривизни до товщини кришки (орієнтовно $3000/8=375$), при цих значеннях $k_e = 0,99$;

$\sigma_{\text{доп}}$ – нормативна напруга, що допускається (160 МПа);

β_1 – безрозмірний коефіцієнт.

$$\beta_1 = 0,5 + \sqrt{0,25 + 12k_e^2 \frac{\sigma_e \sigma_{\text{доп.}}}{E_p}} =$$

(5.7)

$$= 0,5 + \sqrt{0,25 + 12 \times (0,99)^2 \frac{240 \times 160}{1,99 \times 10^5 \times 0,152}} = 4,4.$$

σ_e – мінімальне значення межі пливності (240 МПа).

Відтак,

$$\delta = \frac{0,99 \times 3}{300} \sqrt{\frac{0,152}{10^{-6} \times 1,99 \times 10^5}} + 0,001 + 0,00035 = 0,01 \text{ м};$$

$$\delta = \frac{0,152 \times 3}{2 \times 160} \times 4,4 + 0,001 + 0,00073 = 0,008 \text{ м}.$$

Обираємо менше значення товщини кришки, а саме – 8 мм.

Розрахуємо поверхню кришки:

$$F_k = \frac{1,1 \times 3,14 \times (1,6)^2}{4} = 2,21 \text{ м}^2,$$

(5.8)

де, 1,1 – коефіцієнт, який враховує еліптичність і відбортовку кришки.

Поверхня обох кришок – $2,21 \times 2 = 4,42 \text{ м}^2$. Об'єм металу, потрібний на виготовлення кришок, дорівнює $V_{\text{кр}} = 4,42 \times 0,008 = 0,035 \text{ м}^3$.

Розрахуємо об'єм металу, при товщині сталевих листів 0,001 м, потрібний на виготовлення касет:

$$V_{\text{кас.}} = 11 \times 0,001 \times (1,1)^2 + 11 \times 0,001 \times 4 \times 1,1 \times 0,1 = 0,018 \text{ м}^3.$$

(5.9)

Об'єм металу, при товщині сталевих листів 0,001 м, потрібний на виготовлення плит:

$$V_{\text{пл.}} = 11 \times 2 \times 0,001 \times (1,1)^2 + 11 \times 0,001 \times 4 \times 1,1 \times 0,01 = 0,027 \text{ м}^3.$$

(5.10)

Таким чином, загальний об'єм металу для виготовлення апарату:

$$V_M = 0,05 + 0,035 + 0,018 + 0,027 = 0,13 \text{ м}^3. \quad (5.11)$$

Звідси, маса апарату:

$$m = 0,13 \times 7800 = 1014 \text{ кг}. \quad (5.12)$$

5.2.3 Розрахунок температури теплоносія на вході і на виході з плит

Проведемо розрахунок тепла для сублімації. Секундна витрата тепла на усю поверхню сублімації:

$$q = \beta(P_M - P_L)r_c F = 5 \times 10^{-6}(100 - 15) \times 2833 \times 13,31 = 16,03 \text{ кВт}. \quad (5.13)$$

де, β – коефіцієнт масообміну, с/м, фактично становить $10^{-5} \dots 10^{-6}$ с/м;

P_M – тиск насиченої водяної пари, який відповідає температурі сублімації (при $-20 \dots -40$ °С $P_M \approx 100$ Па);

P_L – тиск насиченої водяної пари, який відповідає температурі на поверхні льоду в конденсаторі (при $-35 \dots -40$ °С $P_L = 15 \dots 40$ Па);

r_c – теплота сублімації (приймаємо значення 2833 кДж/кг);

F – площа поверхні випаровування, м².

Розрахуємо коефіцієнт теплопередачі:

$$K = \frac{1}{\frac{1}{\alpha} + \frac{\delta_c}{\lambda_c} + \frac{\delta_{\text{п}}}{\lambda_{\text{п}}} + \frac{\delta_{\text{л}}}{\lambda_{\text{л}}}}, \quad (5.14)$$

де α – коефіцієнт тепловіддачі від холодоносія до стінки плитки, Вт/(м²·К);

δ_c – товщина стінки плити та касети (1+1=2 мм);

$\delta_{\text{п}}$ – товщина повітряного зазору між плитою та касетою (0,5 мм);

$\delta_{\text{л}}$ – товщина шару льоду, яка змінюється в процесі від 5 до 1,5 мм (в середньому 3,25 мм);

$\lambda_c, \lambda_{\text{п}}, \lambda_{\text{л}}$ – теплопровідності відповідно нержавіючої сталі

(17,5 Вт(м · К)), повітря (0,034 Вт(м · К)) та льоду (2,33 Вт(м · К)).

					ДП 6222. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		126

Для розрахунку коефіцієнта α приймемо, що як холодоносії використовують 30%-й розчин CaCl_2 , густина якого 1286 кг/м^3 , а динамічна в'язкість, згідно з довідниками за температури $-20 \dots -40$ знаходиться в межах $1,44 \dots 22,6 \text{ МПа}\cdot\text{с}$ (приймемо $18,5 \text{ МПа}\cdot\text{с}$); теплопровідність дорівнює $0,437 \text{ Вт/(м}\cdot\text{К)}$, питома теплоємність – $2670 \text{ Дж/(кг}\cdot\text{К)}$ [62].

Приймемо товщину стінки плити 1 мм . Тоді периметр 11-ти плит буде становити:

$$\Pi = 11(2(1,1 - 2 \times 0,001) + 2(0,01 - 2 \times 0,001)) = 24,33 \text{ м.} \quad (5.15)$$

Площа перерізу отворів 11-ти плит:

$$f = 11(1,1 - 0,002) \times (0,01 - 0,002) = 0,0966 \text{ м}^2. \quad (5.16)$$

Еквівалентний діаметр для розрахунку критерію Re :

$$d_e = \frac{4f}{\Pi} = \frac{4 \times 0,0966}{24,33} = 0,0159 \text{ м.} \quad (5.17)$$

Швидкість примусового руху рідини в трубах і каналах повинна становити $1 \dots 3 \text{ м/с}$. Оскільки нема потреби досягати високого значення коефіцієнта тепловіддачі α , тому що коефіцієнт теплопередачі лімітується теплопередачею через повітряний зазор і нерухомий шар льоду в флаконах, приймемо, що швидкість холодоносія в 100 разів менше мінімального значення – $0,01 \text{ м/с}$. Тоді:

об'ємна витрата: $0,01 \times 0,0966 = 0,966 \times 10^{-3} \text{ м}^3/\text{с}$,

масова витрата: $0,966 \times 10^{-3} \times 1286 = 1,24 \text{ кг/с}$.

Критерій Re :

$$Re = \frac{0,01 \times 1286 \times 0,0159}{18,5 \times 10^{-3}} = 11,05. \quad (5.18)$$

Режим течії – ламінарний.

Розрахуємо критерій Прандтля:

$$Pr = \frac{c_p \times \eta}{\lambda} = \frac{2670 \times 0,0185}{0,437} = 113,03. \quad (5.19)$$

					ДП 6222. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		127

Без врахування різниці властивостей рідини в потоці і біля стінки критерій Нусельта при $Re\ 10 \div 1000$ становить:

$$Nu = 0,59 Re^{0,47} Pr^{0,38} = 0,59 \times (11)^{0,47} \times (113,03)^{0,38} = 10,98. \quad (5.20)$$

Коефіцієнт тепловіддачі:

$$\alpha = \frac{Nu \times \lambda}{d_e} = \frac{10,98 \times 0,437}{0,0159} = 301,78 \text{ Вт}/(\text{м}^2 \cdot \text{К}). \quad (5.21)$$

Коефіцієнт теплопередачі К:

$$K = \frac{1}{\frac{1}{301,78} + \frac{0,002}{17,5} + \frac{0,0005}{0,034} + \frac{0,00325}{2,33}} = 34,8 \frac{\text{Вт}}{(\text{м}^2 \cdot \text{К})}. \quad (5.22)$$

Розрахуємо температури на вході теплоносія в плити:

$$\Delta t_{\text{сер}} = \frac{16,03 \times 10^3}{34,8 \times 13,31} = 34,6 \text{ }^\circ\text{C} \quad (5.23)$$

З іншого боку, $\Delta t_{\text{сер}} = 34,6 = 3,7 \times 2,67(t_1 - t_2)$. (5.24). Звідси, $t_2 = -2 \text{ }^\circ\text{C}$, $t_1 = 1,5 \text{ }^\circ\text{C}$.

5.2.4 Розрахунок діаметру вакуумного трубопроводу

Розрахуємо діаметр вакуумного трубопроводу для відведення пари.

Питома масова витрата пари:

$$V_c = \frac{q}{r_c} = \frac{5 \times 10^{-6}(100 - 15)}{2833} = 4,25 \times 10^{-4} \frac{\text{кг}}{(\text{м}^2 \cdot \text{с})}. \quad (5.25)$$

Масова витрата пари з урахуванням коефіцієнта нерівномірності (0,85):

$$\Delta M = 0,85 \times 4,25 \times 10^{-4} \times 13,31 = 0,481 \times 10^{-2} \frac{\text{кг}}{\text{с}}. \quad (5.26)$$

Об'ємна витрата пари:

$$V_{\text{п}} = \frac{0,481 \times 10^{-2} \times 8,3144(273 - 34)}{18 \times 10^{-3} \times 100} = 5,31 \frac{\text{м}^3}{\text{с}}. \quad (5.27)$$

Швидкість руху пари у вакуумних трубопроводах становить приблизно 75 м/с, отже площа перерізу трубопроводу повинна дорівнювати $5,31/75=0,071 \text{ м}^2$ [62].

Відповідно, діаметр трубопроводу повинен становити:

$$D = \sqrt{\frac{F_{\text{пл.пер.}}}{0,8}} = \sqrt{\frac{0,071}{0,8}} = 0,298 \text{ м} \approx 300 \text{ мм.} \quad (5.28)$$

5.2.5 Розрахунок теплових витрат

Тепло, яке віднімається від суспензії в разі охолодження від 8 °С до 0 °С (від T_1 до T_2), обчислюється за формулою:

$$Q_1 = Gc_p(T_1 - T_2) = 257,4 \times 3,1 \times (8 - 0) = 6383,5 \text{ кДж.} \quad (5.29)$$

де G – витрата теплоносія, кг/с;

c_p – питома теплоємність теплоносія, кДж/(кг·К).

Окрім охолодження суспензії, потрібно охолодити камеру, виготовлену зі сталі, яка має масу 1014 кг. Теплота, яку необхідно витратити на її охолодження:

$$Q_k = 1014 \times 0,45 \times (8 - 0) = 3650,4 \text{ кДж.} \quad (5.30)$$

Отже, загальна витрата тепла становить:

$$Q_{\text{заг.}} = 6383,5 + 3650,4 = 10033,9 \text{ кДж.} \quad (5.31)$$

Прийmemo, що для охолодження суспензії використовують холодильну машину, яка охолоджує розсіл до температури $t_1 = -40$ °С, а під час охолодження, згідно з технічними даними, температура розсолу на вході в машину не може бути вище -10 °С (нехай $t_2 = -15$ °С).

Орієнтовно розрахуємо коефіцієнт теплопередачі K від холодоносія до суспензії. Без розрахунків прийmemo, що коефіцієнт тепловіддачі від холодоносія до стінки плити становить $\alpha = 700 \text{ Вт/(м}^2 \cdot \text{К)}$, а теплопередачами крізь стінки плити і піддона знехтуємо [62].

Забруднення на внутрішніх стінках плити від розсолу не відкладаються, а вплив забруднень з боку суспензії незначний, оскільки касети регулярно

					ДП 6222. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		129

очищують під час розвантаження. У той самий час на теплопередачу буде суттєво впливати повітряний зазор між плитою та касетою, який обов'язково утворюється, оскільки конструкцією сублиматора в період завантаження та розвантаження апарату передбачено ковзання касети по плиті подібно шухляді письмового стола. Прийнято, що цей зазор становить 0,5 мм. Коефіцієнт теплопровідності повітря 0,036 Вт/(мК). Тоді коефіцієнт теплопередачі буде становити:

$$K = \frac{1}{\frac{1}{700} + \frac{0,0005}{0,036} + \frac{0,005}{0,62}} = 42,8 \frac{\text{Вт}}{\text{м}^2 \cdot \text{К}}. \quad (5.32)$$

Процес охолодження до 0 °С – нестационарний. Отже, середню різницю температур належить розрахувати за формулою:

$$\Delta t_{\text{сер.ох.}} = \frac{T_1 - T_2}{\ln \frac{T_1 - t_1}{T_2 - t_1}} \times \frac{A - 1}{A \times \ln A}, \text{ де } A = \frac{T - t_1}{T - t_2} = \frac{0 + 40}{0 + 15} = 2,67. \quad (5.33)$$

Наприкінці охолодження $T = T_2 = 0 \text{ } ^\circ\text{C}$.

$$\Delta t_{\text{сер.ох.}} = \frac{8 - 0}{\ln \frac{8 + 40}{0 + 40}} \times \frac{2,67 - 1}{2,67 \times \ln 2,67} = 27,95 \text{ } ^\circ\text{C}. \quad (5.34)$$

Тепло, яке потрібно зняти в процесі заморожування:

$$Q_2 = Gr_T = 257,4 \times 332,8 = 85662,7 \text{ кДж}, \quad (5.35)$$

де r_T – теплота топлення льоду, 332,8 кДж/кг.

Оскільки теплопровідність шару суспензії при переході від рідкої до твердої фази різко змінюється, то нове значення теплопередачі буде становити:

$$K = \frac{1}{\frac{1}{700} + \frac{0,0005}{0,036} + \frac{0,005}{(0,62 + 2,33)/2}} = 53,45 \frac{\text{Вт}}{\text{м}^2 \cdot \text{К}}. \quad (5.36)$$

де 2,33 – теплопровідність льоду, Вт/(м·К).

За умови, що температури холодоносія на вході і на виході з холодильної машини не змінюються, не змінюється й температура суспензії в

процесі заморожування (0°C) і процес є стаціонарним, середня різниця температур становить:

$$\Delta t_{\text{сер.}} = \frac{40 - 15}{\ln \frac{40}{15}} = 25,5 \text{ }^{\circ}\text{C.} \quad (5.37)$$

Визначимо час охолодження шару льоду від температури 0 °C до –35 °C. Процес теплопередачі нестационарний. Загальна кількість тепла, яке потрібно зняти при охолодженні шару льоду:

$$Q_1 = Gc_p(0 + 35) = 257,4 \times 2,14 \times 35 = 19279,26 \text{ кДж.} \quad (5.38)$$

Тепло, яке потрібно відвести при охолодженні металевих конструкцій камери, становить:

$$Q_{3_3} = 1014 \times 0,45 \times 35 = 15970,5 \text{ кДж.} \quad (5.39)$$

Всього потрібно відвести $19279,26 + 15970,5 = 35245$ кДж тепла.

Приймемо, що температура на виході нагрітого холодоносія наприкінці охолодження становить -38 °C. Тоді:

$$A = \frac{-35 - (-40)}{-35 - (-38)} = 1,67. \quad (5.40)$$

$$\Delta t_{\text{сер.ох.}} = \frac{0 + 35}{\ln \frac{0 + 40}{-35 + 40}} \times \frac{1,67 - 1}{1,67 \times \ln 1,67} = 22 \text{ }^{\circ}\text{C.} \quad (5.41)$$

Коефіцієнт теплопередачі становить [62].:

$$K = \frac{1}{\frac{1}{700} + \frac{0,0005}{0,036} + \frac{0,005}{2,33}} = 57,3 \frac{\text{Вт}}{\text{м}^2 \cdot \text{К}}. \quad (5.42)$$

5.2.6 Розрахунок продуктивності апарату

Кількість вологи, яка випаровується в субліматорі за один цикл роботи:

$$W = G_1 \frac{W_1 - W_2}{100 - W_2} = 234 \times 1,1 \frac{85 - 4}{100 - 4} = 217,2 \frac{\text{кг}}{\text{цикл}}, \quad (5.43)$$

де G_1 - продуктивність установки за вологим продуктом, кг/цикл;

					ДП 6222. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		131

W_1, W_2 – початкова та кінцева вологість продукту, %.
за 1 год:

$$W' = \frac{W}{\tau_{об}} = \frac{217,2}{60} = 3,62 \frac{\text{кг}}{\text{год}}. \quad (5.44)$$

де $\tau_{об}$ – загальна тривалість процесу, год.

Годинна продуктивність установки за вологим продуктом:

$$G'_1 = \frac{G_1}{\tau_{об}} = \frac{257,4}{60} = 4,29 \frac{\text{кг}}{\text{год}}. \quad (5.45)$$

за висушеним продуктом [66]:

$$G'_2 = \frac{G_2 - W}{\tau_{об}} = \frac{257,4 - 217,2}{60} = 0,7 \frac{\text{кг}}{\text{год}}. \quad (5.46)$$

5.3 Вибір загальнозаводського обладнання

Для створення розрідження на стадії сублімаційного висушування обрано обертовий вакуум-насос. Насоси такого типу є більш досконалим типом в порівнянні з поршневими насосами. Обраний пластинчасто-статорний насос марки ВН-461М виробництва “АО Вакууммаш” має ряд переваг перед іншими насосами такого ж типу, основна х них – зменшення кількості відповідальних місць всередині насосу, які є небезпечними та можуть спричинити прорив газу у виробничу ємність. Серед інших переваг можна виділити те, що у барабані насосу відсутні прорізи, що нівелює можливість прослизання повітря в сторону впускного патрубку, а також те, що шкідливий простір в цих насосах менший, ніж у пластинчасто-роторних. Матеріал внутрішньої частини – чавун [67].

Для перекачування рідини у плити сублімаційної шафи використовують насос центробіжний консольний марки 2К-6 виробництва ЗАО “Помпа” з переліку у КО 07.01.01.13-04 Насосы. Том 1. Виконання насосу основне – горизонтальне консольне з опорою на корпусі та підведенням від двигуна через пружну муфту. Матеріал для проточної частини насосу – сірий чавун.

					ДП 6222. 00.000 ПЗ	Арк.
						132
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

5.4 Вимоги до охорони праці та навколишнього середовища

Обслуговування сублімаційних установок відноситься до робіт з підвищеною небезпекою відповідно до п. п. №№ 33, 113, 118 Переліку робіт з підвищеною небезпекою, затв. Держнаглядохоронпраці 30.11.1993, № 123.

Всі роботи, що проводяться машиністом, повинні виконуватись відповідно до інструкції з охорони праці для машиністу сублімаційних установок ПІ 1.9.10-030-1999.

Машиніст виконує роботу на постійному робочому місці. До переліку його робіт відноситься:

- ведення технологічного процесу сублімаційного сушіння;
- прийом продукту, завантаження в апарати для заморожування і сублімаційного сушіння;
- дотримання заданого режиму при заморожуванні та висушуванні;
- забезпечення умов стерильності на всіх етапах сублімаційного сушіння;
- контроль за дотриманням технологічного регламенту за показаннями контрольно-вимірювальних приладів і результатами аналізів;
- витримування заданих параметрів температурного режиму;
- виконання інших робіт згідно з Єдиним тарифно-кваліфікаційним довідником і розрядом.

Перед початком роботи з сублімаційним апаратом необхідно:

- перевірити наявність, цілісність і комплектність спецодягу і засобів індивідуального захисту, одягнути їх;
- зробити візуальний огляд сублімаційної установки, перевірити наявність і цілісність захисного заземлення, наявність захисних кожухів установки. При установленні порушення заземлення повідомити механіка цеху про несправність;
- переконатися у відповідності запису в апаратному листі фактичному стану технологічного процесу;
- переконатися в наявності вакууму по приладах (не допускаються до застосування манометри, у яких буде відсутні пломба або тавро,

					ДП 6222. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		133

прострочений термін перевірки, є пошкодження, стрілка при вимкненні не вертається до нульового ділення шкали). На циферблаті манометрів повинно бути фарбою зазначений тиск шкали, відповідний робочому тиску;

–включити припливно-витяжну вентиляцію за 15-20 хвилин до початку роботи;

–при виявлених несправностях обладнання та засобів колективного захисту сповістити керівника робіт (відповідального за проведення даної роботи) та не приступати до роботи до усунення виявлених несправностей.

Технологічне устаткування повинно бути забезпечене необхідними КВПіА (термометрами, манометрами, вакуумметрами) Усі встановлені манометри (мановакуумметри) повинні бути запломбовані та мати клеймо перевірки, що повинна проводитися 1 раз на 12 місяців, а також кожного разу після виконаного ремонту.

Контроль герметичності має здійснюватися за допомогою газових і рідинних методів контролю герметичності згідно з ОСТ 26-Н-14-83 “Сосуды и аппараты, работающие под давлением”.

Очищення газових викидів та стічних вод – це природоохоронні заходи, які мають братися до уваги при проектуванні виробництва.

Очищення повітряних викидів є одним з найактуальніших і найважчих завдань. У біотехнологічному підприємстві технологічні викиди відбуваються на таких ділянках виробництва:

- газові викиди з ферментерів та посівних апаратів;
- відпрацьоване повітря при підготовці первинної тари;
- вентиляційні викиди;
- газові викиди під час пропарювання й продування обладнання і трубопроводів.

Газові викиди з ферментерів та посівних апаратів містять живу мікрофлору та багато інших біологічно-активних сполук, а отже їх очистка необхідною та важливою [62]. Така очистка ступенево проводиться в інших цехах виробництва:

					ДП 6222. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		134

- у циклонах;
- у рукавних фільтрах;
- у пристроях вологої очистки.

Очистка викидів з ферментерів та посівних апаратів здійснюють у фільтрах з попереднім охолодженням газів, пониженням вологості у вологовідбійниках з наступних нагріванням, для уникнення потрапляння крапельної вологи і змочування фільтрів. Можливим є використання систем з каталітичним спалюванням навіть слідів органічних речовин.

Очистка повітря з вентиляційної системи здійснюється на різних фільтрах з волокнистих матеріалів.

Очищене таким чином повітря викидається в атмосферу через трубу розсіювання [62]. Контроль допустимих викидів в атмосферу забруднюючих речовин має здійснюватися за ГОСТ 17.2.3.02-78.

Іншим важливим природоохоронним заходом є очистка стічних вод. Стічні води біотехнологічного підприємства можуть містити мікрофлору. Вже на виході з цеху стічні води стерилізують на нейтралізують. Обролені таким чином води спрямовуються на очисні споруди.

Проводять механічне очищення – стічні води проціджують крізь сітки, фільтрують, відстоюють, оброблюють в гідроциклонах, застосовують флотацію. Ступінь такої очистки складає 50-70%.

Окрім хімічної обробки води може бути використано фізико-хімічне очищення з використанням адсорбентів (вугілля, попелу тощо). Можливим є застосування ультрафільтрування, зворотного осмосу, дистиляції. Ступінь очищення складає 90-95%.

Для очищення від органічних забруднень застосовують біохімічне очищення води в аеротенках або біофільтрах.

Кінцевою стадією очищення є хімічна обробка води: обробка вапном, хлорування, озонування. Ступінь такої очистки складає 80-90%.

При поводженні з відходами необхідно дотримуватись ДСТУ 3911-99, де висвітлено загальні вимоги [62].

					ДП 6222. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		135

ВИСНОВКИ

1. В проєкті для виробництва лікувально-профілактичного пробіотичного препарату Біоспорин обрано спороутворюючі бактерії *B. subtilis* та *B. licheniformis*.

2. Проаналізовано методи селекції промислових пробіотичних штамів та запропоновано схему отримання продуценту шляхом багатоступеневої послідовної обробки ультрафіолетовим опроміненням під УФ-лампю потужністю 12,5 Вт за довжини хвилі 254 нм та з інтенсивністю випромінювання лампи 0,25 мВт/см².

3. Враховуючи фізіолого-біохімічні особливості *B. subtilis* та *B. licheniformis*, обрано склад поживного середовища для виробничого біосинтезу на основі кукурудзяної муки, крохмалю, крейди та сульфату амонію. Визначено раціональні параметри культивування: температура 37±1°C, тривалість 26-36 год, тиск 0,5±0,01 МПа. Деякі параметри культивування для кожного мікроорганізму відрізняються: перемішування при 500 об/хв та 320 об/хв та аерація 0,7 та 0,4 $V_{\text{пов}}/V_{\text{ПС}} \times \text{хв}$ для *B. subtilis* та *B. licheniformis* відповідно.

4. Відповідно до визначених фізико-хімічних та біологічних характеристик продукту для його сушіння обрана і розрахована конструкція сублімаційної сушарки шкафного типу продуктивністю за вологим продуктом 257,4 кг/цикл, яка дозволяє отримати препарат належної якості (кількість КУО не менше $1,1 \times 10^9$) з залишковою вологістю 4%.

5. Запропоновано використання сахарозо-желатинового середовища з додаванням сухого знежиреного молока в якості кріопротектору при висушуванні напівпродукту.

6. У відповідності до вимог до готової форми та якості продукту, розроблено технологічну і апаратурну схеми виробництва лікувально-профілактичного пробіотичного препарату Біоспорин.

					ДП 6222. 00.000 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	ВИСНОВКИ	Стадія	Аркуш	Аркушів
Розробив		Юрченко Е.В.				Д	136	144
Консульт.								
Керівник		Ялабенко О. І.						
Затвер.								
						КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		